

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE LARANJEIRA-
DOCE SOBRE PORTA-ENXERTOS POTENCIALMENTE
RESISTENTES À INFECÇÃO POR '*Candidatus Liberibacter
asiaticus*'**

Leticia Lima de Andrade

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE LARANJEIRA-
DOCE SOBRE PORTA-ENXERTOS POTENCIALMENTE
RESISTENTES À INFECÇÃO POR '*Candidatus Liberibacter
asiaticus*'**

Discente: Leticia Lima de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Augusto Girardi

Coorientadores: Dra. Josiane Cecília Darolt e Dr.

Juan Camilo Cifuentes-Arenas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2024

A553c

Andrade, Leticia Lima de

Caracterização da resposta de laranjeira-doce sobre porta-enxertos potencialmente resistentes à infecção por 'Candidatus Liberibacter asiaticus' / Leticia Lima de Andrade. -- Jaboticabal, 2024

80 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Eduardo Augusto Girardi

1. Aurantioideae. 2. Citrus spp.. 3. híbridos intergenéricos. 4. Huanglongbing. 5. título bacteriano. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE LARANJEIRA-DOCE SOBRE PORTA-ENXERTOS POTENCIALMENTE RESISTENTES À INFECÇÃO POR *Candidatus Liberibacter asiaticus*

AUTORA: LETICIA LIMA DE ANDRADE


ORIENTADOR: EDUARDO AUGUSTO GIRARDI

COORIENTADOR: JUAN CAMILO CIFUENTES ARENAS


COORIENTADORA: JOSIANE CECÍLIA DAROLT

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDUARDO AUGUSTO GIRARDI (Participação Virtual)
EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical / Cruz das Almas/BA

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO AUGUSTO GIRARDI**
Data: 30/10/2024 17:49:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. BÁRBARA HUFNAGEL MACIEL (Participação Virtual)
Station De Neufchateau / CIRAD - Guadeloupe

Documento assinado digitalmente
 **BARBARA HUFNAGEL MACIEL**
Data: 30/10/2024 20:22:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. LAUDECIR LEMOS RAIOL JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **LAUDECIR LEMOS RAIOL JUNIOR**
Data: 30/10/2024 19:37:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 30 de outubro de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leticia Lima de Andrade, nascida em 12 de junho de 1995, em Araraquara – SP, filha de Valdir de Andrade e Angélica Alves de Lima Andrade. Graduada em Engenharia Agrônômica pela Universidade de Araraquara (UNIARA) em janeiro de 2018. Foi bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP, atuando na área de produção animal e emissão de gases de efeito estufa, de março de 2015 até julho de 2017. Foi bolsista de treinamento técnico, atuando no Fundecitrus, Araraquara – SP, com o projeto temático Fapesp “Medidas para a redução das infecções primárias no manejo integrado do *huanglongbing* no cinturão citrícola de São Paulo: viabilidade técnica e econômica”, entre novembro de 2021 e setembro de 2022. Ingressou no mestrado em agosto de 2022 e paralelamente, entre outubro de 2022 e janeiro de 2023 foi bolsista pelo proreio de extensão “Quintais produtivos da Agricultura Familiar e protagonismo feminino no Assentamento Terra Rica – Córrego Rico – São Paulo” da Unesp de Jaboticabal (FCAV), sob supervisão da docente Ana Margarida Theodoro Caminhas. Em março de 2023 iniciou como auxiliar de pesquisa no Fundecitrus/Araraquara-SP. Em outubro de 2024 iniciou como analista de implantação de pomar Júnior na Citrosuco/Matão-SP.

Aos meus avós Rosa (em memória), Juventino (em memória), Enedina e Adolfo (em memória).

Ao meu tio Zé (em memória), que deve estar orgulhoso em me ver trabalhando com o mesmo propósito de sua vida, com amor aos citros.

Aos meus pais, Valdir e Angélica,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus. Ele está em cada detalhe da minha vida e deste trabalho, que desde o início preparou tudo com seu amor inexplicável. Colocou as pessoas certas no meu caminho, que me ajudaram a chegar até aqui. Me deu os melhores pais do mundo, Valdir e Angélica, que me dão amor incondicional e são a minha base. Então a eles vai meu primeiro e maior agradecimento, de todo meu coração.

Ao meu namorado, Gabriel, que chegou quando eu já estava no processo e foi muito paciente, me priorizando e entendendo quando eu não pude estar presente. Você tem todo meu amor. Obrigada por ser meu companheiro e me apoiar em tudo.

Aos meus amigos, minha família de coração, Raquel, Júlia, Fernanda, Luiz Patrezi, Lara, Veridiane e Caioby que também foram pacientes com as minhas ausências e sempre estiveram torcendo por essa realização.

A Mikaela e ao Bruno, minha “equipe nota mil”, que fazem parte dessa jornada, mesmo antes de eu iniciar o mestrado. Vocês são mais que especiais e foram essenciais para meu crescimento, me incentivando, acreditando em mim e torcendo para que eu conseguisse realizar essa etapa.

Aos colegas e amigos do Fundecitrus, cada um, mesmo quem não estava envolvido diretamente no meu experimento, foi importante para meu crescimento e para que o trabalho fosse realizado de forma mais leve e muito mais alegre.

Ao pessoal da estufa, por cuidarem diariamente das minhas plantinhas com muito amor e carinho.

Ao pessoal do laboratório, que me ajudaram muito. Aprendo demais com vocês e saibam que cada mão amiga foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao “Rocket Team”, minha equipe mais que especial:

- Josiane, que foi meu alicerce e uma excelente mentora, que voou alto e me guiou mesmo de longe. Obrigada por me ensinar tanto e por ser, além de uma companheira de trabalho e coorientadora, uma amiga que levo no coração para sempre. Assim como sua típica frase: “Hoje eu mereço”, hoje e sempre você merece meus agradecimentos;

- Pedro, que chegou no comecinho de tudo, quando eu estava completamente perdida e foi meu companheiro, que aprendeu junto comigo e juntos fomos evoluindo. Você é muito especial, um amigo e irmão. Sou grata por toda alegria que você me proporcionou e toda ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa;

- Vanessa, minha amiga e parceira diária, que me incentiva, está sempre torcendo por mim e vibrando com cada avanço. Você é muito especial. Obrigada por estar comigo nessa jornada, por toda a ajuda, risadas, choros e tudo que viemos aprendendo juntas;

- Estevão, que mesmo por pouco tempo, contribuiu grandemente com o sucesso desse trabalho. Obrigada por trazer alegria na reta final dessa jornada.

Ao Fabrício, Monica e Marina, pelo apoio, orientações e contribuições, muito importantes, na finalização deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Josiane e Juan, por todo o apoio, conselhos e ajuda para realização desta pesquisa.

Ao Renato por me dar a oportunidade de trabalhar no Fundecitrus ao mesmo tempo em que realizava o mestrado. Sua confiança em mim foi essencial para que eu conseguisse concluir essa etapa.

E por fim, ao meu orientador, Eduardo Girardi. Obrigada por confiar em mim, por me proporcionar essa oportunidade única, pelos puxões de orelha e por me tratar como uma filha. Saiba que me inspiro demais na sua pessoa, tanto pessoal, como profissional. É admirável todo o seu conhecimento e a forma prazerosa como você repassa esse conhecimento, dá pra notar toda sua dedicação e amor a profissão. Chorei enquanto escrevia meus agradecimentos. Então saiba que todas as lágrimas que derramei na sua frente e longe também, continham gotas de agradecimento e felicidade pela oportunidade.

Cada pessoa que citei aqui tem um pedacinho no meu coração e, direta ou indiretamente, todos merecem o mérito do meu trabalho.

Novamente, obrigada a Deus pelas bênçãos sem fim, pelas bênçãos que não consigo contar e por essa dissertação, que é uma realização profissional e pessoal e também é uma bênção.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Importância socioeconômica dos citros no Brasil e no mundo	4
2.2 Classificação botânica.....	6
2.3 Porta-enxertos na citricultura.....	8
2.4 Huanglongbing dos citros (HLB).....	11
2.5 Resistência genética e uso de porta-enxerto como estratégia para o manejo do HLB	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Local de execução dos ensaios	18
3.2 Material vegetal	18
3.2.1 Delineamento experimental.....	19
3.3 Criação de psíldeos infectivos e inoculação de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '	21
3.4 Amostragem das plantas.....	22
3.5 Extração do DNA vegetal e detecção de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '	23
3.6 Caracterização biométrica das diferentes combinações copa/porta-enxerto e matéria seca das raízes	24
3.7 Avaliação visual de compatibilidade de enxertia e sintomas de CTV	25
3.8 Análises de expressão relativa	26
3.8.1 Amostragem das plantas	26
3.8.2 Extração do RNA.....	26
3.8.3 Tratamento com DNase e síntese do cDNA	28
3.8.4 Seleção dos alvos para os ensaios de expressão genica	28
3.9 Análise dos dados	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Biometria das diferentes combinações de copa e porta-enxerto momento da inoculação com ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '	31

4.2 Biometria das diferentes combinações de copa e porta-enxerto aos 6 meses após a infecção.....	32
4.3 Taxa de infecção e título de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' aos 6 meses após a infecção.....	35
4.4 Biometria das diferentes combinações de copa/porta-enxerto aos 12 meses após a infecção com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	36
4.5 Taxa de infecção e título de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> aos 12 meses após a infecção.....	38
4.6 Matéria seca das raízes e avaliação visual de compatibilidade de enxertia e sintomas de HLB e CTV.....	42
4.8 Expressão relativa de genes	47
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS.....	57

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE LARANJEIRA-DOCE SOBRE PORTA-ENXERTOS POTENCIALMENTE RESISTENTES À INFECÇÃO POR '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

RESUMO - A produção de laranja-doce do Brasil se destaca no cenário mundial, porém problemas fitossanitários têm colocado em risco a viabilidade econômica da cultura. O Huanglongbing (HLB) é a doença mais destrutiva e preocupante, pois resulta em redução da vida econômica, produtividade e qualidade da fruta e suco. A doença está associada principalmente à bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). Não existem métodos curativos eficientes e nem variedades comerciais resistentes. Desse modo, a busca por resistência à CLas em espécies próximas a *Citrus* ssp. e híbridos intergenéricos tem sido amplamente investigada, notadamente em *Eremocitrus* e *Microcitrus* originados na Oceania. Sabe-se que o porta-enxerto (PE) exerce influência direta na copa sobre diversos atributos de interesse, incluindo a tolerância a doenças, citando-se o sucesso no manejo da tristeza dos citros (CTV). Desse modo, em condições controladas, três genótipos derivados de híbridos de *Eremocitrus* e *Microcitrus* que em estudos anteriores apresentaram resistência à bactéria [BGC682, BGC695 e *M. australis* × *M. inodora*] foram avaliados na posição de PE de laranjeira-doce 'Valencia' e comparados com o controle de citrumelo Swingle. As diferentes combinações de copa/PE foram desafiadas pela infecção por CLas via confinamento de insetos infectivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2 (porta-enxertos x infecção por CLas) e com 4 a 26 repetições (plantas individuais em recipientes). Aos 6 e 12 meses após a inoculação (MAI), foi avaliada a dinâmica da infecção e colonização por CLas pela amostragem de folhas da copa, casca do PE e copa, e raízes. Avaliaram-se ainda características de crescimento vegetativo, matéria seca total das raízes e a resposta diferencial da copa pela expressão relativa de genes-chave relacionados à resposta de defesa. Aos 6 e 12 MAI, BGC682 e *M. australis* apresentaram menor desenvolvimento de planta e ficou em um nível intermediário em relação ao controle de Swingle, avaliando-se os parâmetros biométricos de diâmetro do caule da copa e do PE, altura de copa de número de ramos. Aos 6 MAI, BCG682 e *M. australis* × *M. inodora* tiveram taxas de inoculação menores que BCG695 e Swingle, e aos 12 MAI, em BCG682 e *M. australis*, apesar de terem apresentado a presença da bactéria nas cascas do PE, ela não foi detectada nas raízes. Devido à alta sensibilidade ao CTV observada nos híbridos não foi possível inferir se a diferença na matéria seca de raiz ocorreu devido ao CTV ou a inoculação com CLas e não observamos expressão diferencial de genes relacionados aos mecanismos de defesa. Conclui-se que o genótipo BCG695 não foi capaz de conter a bactéria em suas raízes e os genótipos BCG982 e *M. australis* × *M. inodora* não permitiram que a bactéria CLas se estabelecesse em suas raízes, mas, em razão do CTV não foi possível caracterizar o efeito da ausência de CLas na copa. Nenhum dos genótipos estudados na posição de porta-enxerto foi capaz de reduzir o título bacteriano na copa de laranjeira-doce suscetível à CLas.

Palavras-chave: Aurantioideae, *Citrus* spp., híbridos intergenéricos, Huanglongbing, título bacteriano, sistema radicular.

CHARACTERIZATION OF THE RESPONSE OF SWEET ORANGE TREE ON ROOTSTOCKS POTENTIALLY RESISTANT TO INFECTION BY '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

ABSTRACT – Brazil's Sweet Orange production stands out on the world stage, but phytosanitary problems have put the economic viability of the crop at risk. Huanglongbing (HLB) is the most destructive and worrying disease, as it results in reduced economic life, productivity and quality of fruit and juice. The disease is mainly associated with the bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas). There are no efficient curative methods and no resistant commercial varieties. Therefore, the search for resistance to CLas in species close to *Citrus* spp. and intergeneric hybrids have been widely investigated, notably in *Eremocitrus* and *Microcitrus* originating in Oceania. It is known that the rootstock (RS) has a direct influence on several attributes of interest in the scion, including disease tolerance, citing success in the management of citrus sadness. Thus, under controlled conditions, three genotypes derived from hybrids of *Eremocitrus* and *Microcitrus* that in previous studies showed resistance to the bacteria [BGC682, BGC695 and *M. australis* × *M. inodora*] were evaluated in the 'Valencia' sweet orange RS position and compared with the control of Swingle citrumelo. The different canopy/RS combinations were challenged by CLas infection through the confinement of infective insects. The experimental design was completely randomized in a 4x2 factorial scheme (rootstocks × CLas infection) and with 4 to 26 replications (individual plants in containers). At 6 and 12 months after inoculation (MAI), the dynamics of infection and colonization by CLas were evaluated by sampling leaves from the canopy, RS bark and canopy bark, and roots. Characteristics of vegetative growth, total dry matter of the roots and the differential response of the canopy were also evaluated through the relative expression of key genes related to the defense response. On 6 and 12 MAI BGC682 and *M. australis* × *M. inodora* showed lower plant development and BGC695 was at an intermediate level in relation to Swingle control, evaluating the biometric parameters of canopy diameter and RS, canopy height and number of branches. At 6 MAI BCG682 and *M. australis* × *M. inodora* had lower inoculation rates than BCG695 and Swingle, and at 12 MAI, in BCG682 and *M. australis* × *M. inodora*, despite having presented the presence of the bacteria in the RS shells, it was not detected in the roots. Due to the high sensitivity to CTV observed in the hybrids, it was not possible to infer whether the difference in root dry matter was due to CTV or inoculation with CLas. We did not observe differential expression of genes related to defense mechanisms. It is concluded that the BCG695 genotype was not able to contain the bacteria in its roots and the BCG982 and *M. australis* × *M. inodora* genotypes did not allow the CLas bacteria to establish themselves in their roots, but, due to the CTV it was not possible to characterize the effect of the absence of CLas in the scion. None of the genotypes studied in the rootstock position was able to reduce the bacterial titer in the scion of sweet orange trees susceptible to CLas.

Keywords: Aurantioideae, *Citrus* spp., intergeneric hybrids, Huanglongbing, bacterial titer, root system.

1. Introdução

A citricultura brasileira tem grande relevância socioeconômica, pois o país é o segundo maior produtor de citros e o maior em produção de suco de laranja-doce do mundo (FAO, 2021), sendo o estado de São Paulo o maior produtor, concentrando 62,3% do total da produção nacional (IBGE, 2024).

Com a concentração da produção no cinturão citrícola, que engloba o estado de São Paulo e Sudoeste e Sul do Triângulo Mineiro, problemas fitossanitários diversos acometem a cultura dos citros, sendo o Huanglongbing (HLB) considerada a doença mais destrutiva (Bové, 2006). O HLB foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2004, na região de Araraquara no estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Desde o primeiro relato, e com a crescente disseminação da doença nos pomares comerciais, o HLB vem causando prejuízos que envolvem a erradicação de plantas sintomáticas e a redução da longevidade dos pomares, acarretando em perda de produção e redução na quantidade/qualidade de frutos. Diante desse cenário, o HLB tem colocado em risco a viabilidade da atividade comercial de citros no país (Bassanezi et al., 2009; 2020).

O HLB está associado à bactérias gram-negativas, restritas ao floema das plantas infectadas, do gênero '*Candidatus Liberibacter*' spp. pertencentes a três espécies: '*Candidatus Liberibacter africanus*' (CLaf), '*Candidatus Liberibacter americanus*' (CLam) e '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) (Laflèche e Bové, 1970; Jagoueix et al., 1994), sendo CLas de maior importância e predominância no Brasil. No país, inicialmente, CLam foi o patógeno mais amplamente distribuído no Estado de São Paulo (Teixeira et al., 2005), porém rapidamente este cenário mudou, atualmente CLas é a mais predominante, pois contém características que conferem a ela maiores vantagens epidemiológicas e competitivas sobre CLam, como maior título bacteriano e maior resistência à temperaturas mais elevadas (Lopes et al., 2009, 2013; Bassanezi et al., 2020).

No campo, a bactéria é transmitida naturalmente pelo inseto vetor, o psílideo asiático dos citros, *Diaphorina Citri* [Hemiptera: (Liviidae)]. O psílideo foi relatado no Brasil em 1940, mas, anteriormente ao primeiro relato de HLB, esse inseto era considerado uma praga secundária; entretanto, após a sua associação com a

disseminação do HLB, passou a ser uma das principais pragas da cultura dos citros (Xu et al., 1988).

Uma das características que tornam difícil o controle do HLB é o longo período decorrente entre a inoculação e o surgimento dos sintomas iniciais da doença nas plantas infectadas. Esse intervalo é conhecido como período de incubação e que é variável, com duração de no mínimo quatro meses (Lopes e Frare, 2008; Canale et al., 2017). Durante esse período, as plantas infectadas, mas que não apresentam sintomas, servem de inóculo secundário para a proliferação da bactéria, dificultando o manejo da doença. Sabe-se que a distribuição da bactéria na planta é irregular e CLas se movimenta de maneira descendente ou ascendente em direção aos tecidos em crescimento; após a inoculação em brotos na copa, é translocada ao sistema radicular, causando danos na raiz antes mesmo que os prejuízos sejam visíveis na copa (Kunta et al., 2014; Raiol-Junior et al., 2021, Johnson et al., 2014).

Como não existem métodos curativos eficazes para o manejo do HLB, as medidas preventivas recomendadas aos produtores envolvem o plantio de mudas sadias produzidas em ambiente protegido, a inspeção de plantas para identificar a presença de sintomas da doença, o uso de armadilhas amarelas para detectar a presença do inseto vetor, o uso de produtos químicos e outros tipos de controle para conter a ocorrência do inseto vetor e erradicação de plantas doentes (Bové, 2006; Belasque-Junior et al., 2010a; Bassanezi et al., 2020).

Para o sucesso do controle da disseminação da doença, as medidas de controle adotadas exigem senso de coletividade entre os citricultores e os proprietários de áreas externas. É necessário que ambos tomem as medidas preventivas mencionadas acima para que plantas de citros infectadas não sirvam como fontes de inóculo de um local para o outro, tornando o manejo regional do HLB bastante complexo (Bassanezi et al., 2020). Além disso, outro fator que influencia na dificuldade do manejo é a dependência do uso do controle químico, por ser a maneira mais eficaz de reduzir as populações do inseto vetor. Porém, pelo uso indevido e a falta de rotação de inseticidas, vem acarretando a seleção de indivíduos resistentes e dificultando o controle do inseto (Miranda et al., 2024).

Nesse cenário, que envolve a dificuldade do manejo da doença e a inexistência de variedades comerciais resistentes ou tolerantes à bactéria, a busca por medidas

que diminuam a incidência ou amenizem os efeitos da doença a longo prazo tem sido priorizada. Uma das maiores expectativas para melhorar o manejo do HLB é a obtenção de novas variedades de copas ou porta-enxertos resistentes a bactéria, fator que vem sendo amplamente explorado e estudado a partir da identificação de algumas fontes de resistência à CLas (Ramadugu et al., 2016; Albrecht e Bowman, 2019; Alves et al., 2021b).

Em relação às fontes de resistência à CLas, enquanto as espécies de *Citrus* e *Poncirus* são suscetíveis (Folimonova et al., 2009; Albrecht e Bowman, 2011; 2012a, b), recentemente *Eremocitrus glauca* e *Microcitrus* spp., bem como alguns de seus híbridos, foram identificados como resistentes à CLas (Alves et al., 2021b, 2022), validando observações de campo na Flórida (Ramadugu et al., 2016). Entretanto, esses trabalhos de caracterização avaliaram diferentes genótipos ou na posição de copa em condições controladas, ou como pé franco em campo, respectivamente, e não na posição de porta-enxerto.

Sabe-se que o porta-enxerto exerce influência direta no desenvolvimento das plantas, seja em relação a fatores abióticos como bióticos (Martínez-Cuenca et al., 2016), como no caso do patossistema *Citrus* x vírus da tristeza dos citros (CTV, em inglês), no qual verificou-se que o uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes ao vírus restaurou a produção e viabilizou o manejo da doença em pomares comerciais. Até os anos 1940, a maioria dos citros eram enxertados em laranjeira-azedada, que perdeu o interesse comercial por ser susceptível à tristeza e foi substituída principalmente por porta-enxerto de limoeiro 'Cravo', tolerante ao CTV (Garnsey et al., 1987; Moreno et al., 2008, Bowman e Joubert, 2020). Mais recentemente, a partir de 2000, o limoeiro 'Cravo' se mostrou intolerante à outra doença, a morte súbita dos citros (MSC), sendo gradativamente substituído por outros porta-enxertos como o citrumelo 'Swingle' (Bassanezi et al., 2007).

Sendo desconhecidas até o momento informações da interação hospedeiro-patógeno e resposta à infecção em plantas que apresentem resistência potencial à CLas na posição de porta-enxerto, o presente trabalho visou desafiar laranjeiras-doce 'Valência' enxertadas em genótipos caracterizados como resistentes ao HLB quanto à infecção e dinâmica da colonização nessas plantas por CLas. Acredita-se que o uso de porta-enxerto resistente à CLas possa influenciar na resposta à infecção e

colonização da bactéria na copa de laranjeira-doce suscetível e restringir o título e distribuição bacteriana nos tecidos do porta-enxerto, com consequente redução de danos pelo HLB.

2. Revisão de Literatura

2.1 Importância socioeconômica dos citros no Brasil e no mundo

Historicamente, a cultura dos citros tem grande importância mundial, pois sua ampla variedade de tipos de frutos é consumida no mundo todo de diversas formas. Os principais países produtores de citros, de 1961 até 2022 incluem o Brasil, China, Estados Unidos da América, México, Índia e Espanha (FAO, 2023). Os frutos mais produzidos no mundo são as laranjas, tangerinas, limas e limões e os pomelos, que podem ser consumidos *in natura* e como suco processado, além de serem usados na fabricação de doces e na exploração de seus subprodutos, como o d-limoneno e o farelo de polpa peletizado (Berk, 2016).

Segundo dados da FAO (2023) o mundo produziu 76 milhões de toneladas de laranja e 14 milhões de outros tipos de citros em 2022, sendo que 16 mil toneladas de laranja foram produzidas no Brasil em uma área plantada de 568 mil ha. Devido às suas propriedades organolépticas, os compostos de cítricos e seus óleos essenciais são amplamente utilizados nas indústrias cosmética, farmacêutica, aromas e perfumaria, alimentícia e química (Hsouna et al., 2023). Além disso, os citros são muito consumidos por seus atributos nutricionais com propriedades promotoras da saúde que incluem a vitamina C, ácido fólico, potássio, pectina, polifenóis, carotenoides, ácidos orgânicos, fibras alimentares e óleos essenciais (Suri et al., 2022).

No Brasil, os primeiros registros de plantio foram feitos por volta de 1540 na Capitania de São Vicente (Cananéia) no estado de São Paulo e por volta de 1549 na Bahia (Webber et al., 1967; Chapot, 1975; Campos, 1976; Coelho, 1992). Um dos grandes diferenciais é o fato de que a cultura se adaptou muito bem no país, até melhor do que na região de origem, pois se adaptam muito bem em regiões subtropicais, onde se verifica maior desenvolvimento da cultura (Passos et al., 2013).

A partir das décadas de 1970 e 1980, o Brasil começou a ganhar mais espaço nos investimentos relacionados à produção de laranja-doce pois diversas geadas que

atingiram a Flórida, que era a região de maior destaque na produção da fruta, causaram muitos prejuízos na produção e permitiu que a indústria cítrica no Brasil se consolidasse, tornando o país o maior produtor de laranja-doce e suco de laranja do mundo (Geraldello, 2015). Mais recentemente, no início dos anos 2000, a produção da Flórida, que estava se recuperando, foi atingida por furacões que devastaram os pomares e permitiram a entrada do cancro cítrico, além disso, foi relatada a presença do HLB a partir de 2005 (Halbert, 2005), causou uma redução nas áreas plantadas, abrindo novamente oportunidade para o Brasil se destacar ainda mais no mercado exportador de suco de laranja-doce (Neves et al., 2010).

Em razão disso, o Brasil desempenha um papel relevante na cadeia produtiva dessa *comodity*, sendo o segundo maior produtor de citros e o maior produtor de laranja-doce e exportador de suco do mundo (IBGE, 2022). O país tem um destaque tão significativo que a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três foram produzidos no Brasil (CitrusBR, 2019). Além disso, o setor tem impacto considerável na geração de empregos, renda e domínio do mercado internacional. Com isso, o setor ganha para o país US\$189 milhões arrecadados pela cadeia produtiva, US\$6,5 bilhões para o PIB do setor cítrico, gera 200 mil empregos diretos e indiretos e arrecada US\$2 bilhões em exportações por ano (CitrusBR, 2019).

Atualmente, o país tem 580.845 ha de área plantada ou destinada à colheita de laranja, dos quais 361.856 ha estão presentes no estado de São Paulo (IBGE, 2024). O cinturão cítrico, que compreende as regiões do estado de São Paulo, Triângulo Mineiro e Sudoeste de Minas, produziu 307,22 milhões de caixas de laranja-doce, das quais 80% das caixas são destinadas a produção de suco e 95% são atribuídos à exportação (Fundecitrus, 2024; CitrusBR, 2019).

Além desses fatores, segundo dados da Embrapa/Fundecitrus (2024a, b), no cinturão cítrico, a cada 2 hectares de área de pomares produtivos há 1 hectare de área de preservação. E entre as áreas produtivas e de preservação, foram identificadas 314 espécies de animais silvestres, principalmente aves e mamíferos, e cerca de 36 milhões de toneladas de carbono foram estocadas nas laranjeiras, solo e áreas de vegetação nativa.

2.2 Classificação botânica

Segundo a classificação de Swingle e Reece (1967), a subfamília Aurantioideae, pertencente à família Rutaceae, é composta por duas tribos, a Clausenae e Citreae, que por sua vez são subdivididas em subtribos. Dentro da tribo Citreae, a subtribo Citrinae se destaca pela sua particularidade em possuir gêneros com frutos comestíveis que possuem vesículas de suco e glândulas de óleos essenciais com aroma típico. A subtribo Citrinae abrange três grupos cítricos, que são respectivamente os citros primitivos, os parentes próximos de citros e os citros verdadeiros (Passos et al., 2013).

O grupo dos citros verdadeiros inclui seis gêneros: *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia* segundo a classificação de Swingle e Reece (1967), que ainda permanece popular na comunidade científica de citros (Ollitrault, 2020). Entretanto, estudos recentes propõem uma nova definição, que integraria todos os gêneros dos citros verdadeiros em um único gênero, o *Citrus* (Mabberley, 1998; 2004; Zhang e Mabberley, 2008), tendo em vista a compatibilidade sexual entre as espécies de citros verdadeiros e estudos relacionados a monofilia e sequenciamento de genoma (Bayer et al., 2009; Carbonell-Caballero et al., 2015).

Apesar dessa possível mudança para um único gênero, optou-se por descrever as características dos gêneros, de forma isolada, seguindo a classificação de Swingle e Reece (1967) para facilitar a comunicação. A seguir serão descritas as características dos gêneros *Citrus*, *Eremocitrus* e *Microcitrus*, pois são objetos de estudo dessa pesquisa.

No gênero *Citrus*, a taxonomia é complexa e não há um número preciso de espécies naturais, pois atualmente acredita-se que a maioria de suas espécies são de origem híbrida e não consistem em espécies puras (Barkley et al., 2006; Scora, 1975; Nicolosi et al., 2000). Estudos baseados em quimiotaxonomia e morfologia sugerem três espécies principais que deram origem à maioria das frutas cítricas cultivadas, são elas *C. maxima*, *C. reticulata* e *C. medica* (Mabberley, 1997; Wu et al., 2018). Sendo assim, acredita-se que a laranja-doce [*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck], muito cultivada comercialmente, seja provavelmente um híbrido entre *C. maxima* e *C. reticulata* (Frederic et al., 1998).

Citrus constitui o gênero de plantas arbóreas, árvores de grande ou médio porte e forma de plantas variáveis. Possuem folhagem verde e abundante e suas folhas, normalmente, são unifoliadas e com a presença de pecíolo, que varia de tamanho grande (pomelos), médio (laranjas e limões) ao pequeno (tangerinas). As folhas são perenes com duração variada e geralmente seus ramos possuem espinhos presentes nas axilas. As flores de *Citrus* são uni ou multiflorais, possuem cinco sépalas, cinco pétalas e de 20 a 40 estames soldados, com pólen comumente fértil (Swingle e Reece, 1967).

Os frutos de *Citrus* possuem diversos tamanhos e formas, do tipo baga, sendo esféricos (laranjas), esférico-achatados (pomelos e tangerinas) ou ovais (limas e limões). Seus frutos contêm gomos repletos de vesículas com suco e envoltas por uma casca destacável, espessa e firme. Além disso, a parte exterior da casca possui numerosas glândulas de óleo perfumadas visíveis a olho nu ou contra o sol (Deng et al., 2020).

No interior dos frutos, quando presentes, as sementes estão presas adaxialmente, perto do eixo central ou núcleo. São esféricas a ovais, pequenas a grandes, lisas a rugosas e recalcitrantes. Sua coloração varia de branca a verde, esta última normalmente em tangerinas. Têm característica em geral poliembriônica, nas quais contém vários pares de cotilédones, incluindo um embrião zigótico e outros embriões nucelares. A poliembrião encontrada na maioria das sementes de espécies do gênero *Citrus*, possibilita a rápida multiplicação dos genótipos, principalmente no uso como porta-enxerto. Seus embriões nucelares geram clones idênticos à planta-mãe, que são utilizados para replicação dos genótipos de interesse (Pompeu Junior, 2005).

Os gêneros *Eremocitrus* e *Microcitrus*, endêmicos da Oceania, possuem uma e seis espécies, respectivamente. São formados pelas chamadas limas selvagens australianas e de Papua-Nova Guiné (*round*, *finger* e *desert limes*), locais onde julga-se serem originadas de um ancestral primitivo que ficou sob especiação na Austrália à medida que essas ilhas foram separadas (Swingle e Reece, 1967; Hashemian et al., 2010). Tanto *Eremocitrus* como *Microcitrus* possuem característica de sementes monoembriônicas, com um embrião normalmente zigótico, que geram descendentes heterogêneos, com características diferentes da planta-mãe (Pompeu Junior, 2005).

Eremocitrus é formado por uma única espécie, *Eremocitrus glauca*, a lima do deserto australiana. As folhas são unifoliadas, muito grossas e coriáceas com coloração verde-acinzentada e geralmente possuem muitos espinhos. Suas flores são pequenas, com estames livres e um ovário com três a cinco lóculos. Seus frutos são pequenos e têm formato subgloboso ou obovóide com coloração amarela quando maduro. Além disso, seus frutos possuem vesículas pulpareas pequenas e subglobosas, com sementes pequenas e ovais. *Eremocitrus* tem característica xerófita, sendo capaz de suportar secas severas e ventos quentes e secos (Ollitrault et al., 2020).

Microcitrus, com 6 espécies (*M. warburgiana*, *M. australis*, *M. inodora*, *M. maideniana*, *M. australasica* e *M. garrawayi*), assim como o próprio nome indica, pelo prefixo “Micro”, possui folhas, flores e frutos menores que outras espécies cítricas, exceto *Eremocitrus*. Suas folhas são unifoliadas, pequenas e coriáceas e geralmente possuem muitos espinhos. As flores são pequenas, com estames livres e o ovário tem de quatro a oito lóculos. Seus frutos têm formas variadas, de globoso a ovóide ou cilíndrico, são longos e esguios, às vezes curvos. Quando maduros, a coloração dos frutos varia de amarelo-esverdeado a preto. É conhecido como o caviar vegetal, muito utilizado na culinária, devido a sua polpa conter vesículas de suco soltas com óleo. São considerados semi-xerófilos, podendo resistir a períodos prolongados de seca (Ollitrault et al., 2020).

Devido às suas características importantes e de interesse comercial, além de serem sexualmente compatíveis com *Citrus* e, por vezes, aptos para enxertia, as espécies de *Microcitrus* e *Eremocitrus* têm sido muito utilizados em diversos programas de melhoramento genético (Deng et al., 2020; Smith et al., 2024). Além de terem se mostrado muito promissores quanto à resistência genética à bactéria associada ao HLB (Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021b, 2022).

2.3 Porta-enxertos na citricultura

O uso de porta-enxertos na citricultura é essencial para quebra de barreiras que dificultam a produção comercial desses frutos. Um dos principais objetivos do uso de porta-enxerto é ampliar a produção de uma grande quantidade de árvores e de

maneira rápida, que serão geneticamente idênticas e com as mesmas características de fruto da planta-mãe (Bowman e Joubert, 2020). As sementes de *Citrus*, por apresentarem em sua maioria, característica poliembriônica, são uma grande aliada na propagação dos porta-enxertos. Por outro lado, algumas variedades de interesse, tanto de espécies de *Citrus* bem como de parentes próximos, podem ser desprovidas de sementes ou terem característica monoembriônica, dificultando a propagação homogênea desses genótipos. Sendo assim, algumas alternativas, como estaquia e cultivo de tecidos, são necessárias (Pompeu Junior, 2005).

Ainda, o uso da propagação de um enxerto maduro em um porta-enxerto é importante para evitar o período de juvenilidade, uma vez que plantas obtidas por semente levam em média sete anos para atingir a maturidade e produzir frutos, enquanto mudas obtidas por enxertia de tecido adulto podem levar de dois a três anos para começar a produzir comercialmente (Bowman e Joubert, 2020). Além desses fatores, o porta-enxerto exerce grande influência na copa das plantas, em aspectos bióticos e abióticos, atuando no tamanho da planta, aumento da produtividade, melhor qualidade de frutos, tolerância à seca e outras condições adversas de clima, resistência ou tolerância a diversas doenças, entre outros (Sobrinho et al., 2013).

No Brasil, o uso de porta-enxerto iniciou-se por volta dos primórdios do século XX, ao mesmo tempo em que a cultura começou a se expandir comercialmente e pela descoberta das vantagens do uso da enxertia. A princípio, o porta-enxerto mais utilizado era a laranjeira-doce (*Citrus xaurantium* L. var. *sinensis* L.) 'Caipira' (Oliveira et al., 2008), porém essa cultivar demonstrou baixa tolerância à seca e suscetibilidade à gomose ou podridão causada por *Phytophthora* spp. e, por esse motivo, foi substituída principalmente pela laranjeira 'Azeda' (*Citrus xaurantium* L.) (Sobrinho et al., 2013).

O porta-enxerto de laranjeira 'Azeda' pode ser considerado o de maior notoriedade. Anteriormente foi muito utilizado como copa por possuir características comerciais interessantes, como a fragrância e sabor para culinária, mas que se tornaram secundárias após a expansão do uso como porta-enxerto. Seu uso como porta-enxerto demonstrou muitas características de interesse, como propagação uniforme de sementes, adaptação ao solo e boa influência na copa com a produção de frutos de alta qualidade (Bowman et al. 2021).

No entanto, um marco importante na história dos porta-enxertos, foi a introdução do *vírus da tristeza dos citros* (CTV em inglês), disseminado por borbulha ou pulgão-preto (Meneghini, 1946). O CTV dizimou os pomares nas décadas de 1930/40 que tinham como porta-enxerto a laranjeira 'Azeda', suscetível à doença, causando a morte de 9 milhões das 11 milhões de árvores plantadas no Brasil. Restaram somente as árvores de pé-franco e aquelas que eram enxertadas em laranjeira-doce 'Caipira' e limoeiro 'Cravo'. A partir disso, estudos conduzidos pelo Instituto Agrônomo, em São Paulo, demonstraram que os porta-enxertos limoeiro 'Cravo', laranjeira 'Caipira', tangerineira 'Cleopatra' e limoeiro 'Rugoso' tinham tolerância ao CTV e passaram a ser utilizados pelos citricultores (Müller et al., 2005).

A partir desse ocorrido, o principal porta-enxerto utilizado pelos citricultores foi o limoeiro 'Cravo', que era também muito tolerante à seca. Entretanto, a mudança de porta-enxerto gerou novos problemas, pois a grande maioria das variedades copas usadas na época eram clones velhos infectados com viroides da exocorte e da xiloporose, sendo o limoeiro 'Cravo' suscetível (Sobrinho et al., 2013).

Em seguida, o surgimento do declínio dos citros, na década de 70, também limitou o uso do porta-enxerto de limoeiro 'Cravo'. Estimou-se na época, que 6 a 8% das plantas no estado de São Paulo eram atingidas anualmente, tornando, em média, 10 milhões de plantas improdutivas (Baldassari et al., 2003). Mais tarde, identificada em 2001, a MSC, restrita ao triângulo Mineiro e norte e noroeste de São Paulo, também foi um limitante para o uso do porta-enxerto de limão 'Cravo', além dos limões 'Volkameriano' e 'Rugoso'. É uma doença de etiologia desconhecida e que, a partir do surgimento dos sintomas, as plantas morrem rapidamente (Gimenes-Fernandes e Bassanezi, 2001; Bassanezi et al., 2003).

Contudo, observou-se que somente trocar o porta-enxerto não seria o suficiente para sanar os problemas fitossanitários e sim o uso adequado do porta-enxerto associado ao uso de matrizes livres de vírus e viroides, usando clones limpos ou novos. Desde então, tornou-se necessária a busca permanente pela diversidade de porta-enxertos que fossem tolerantes às doenças que acometem a cultura dos citros (Sobrinho et al., 2013).

Anteriormente, a dependência de sementes para a propagação de porta-enxertos retardou o acesso a diversos porta-enxertos potenciais. Entretanto, com a

existência de vários programas de melhoramento genético e testes para novos porta-enxertos, como o uso de micropropagação e transformação genética, trouxeram diversas possibilidades, abrindo ainda mais portas para a diversidade de porta-enxertos (Bowman e Joubert, 2020). Com o surgimento do HLB, muitos experimentos nesse seguimento vêm sendo conduzidos (Bowman e McCollum, 2015; Bowman et al., 2016a, b), pois acredita-se que a utilização da interação copa/porta-enxerto possa ser uma possibilidade para sanar as dificuldades de manejo relacionadas à essa doença (Santos, 2013; Gill et al., 2024).

2.4 Huanglongbing dos citros (HLB)

O HLB é uma doença dos citros que foi descrita pela primeira vez na Ásia em 1919. Inicialmente chamado de “doença do ramo amarelo”, do inglês “*yellow shoot*”, devido ao primeiro sintoma característico e visível, que consiste no aparecimento de ramos amarelados nos ponteiros da copa das plantas. Na China, no distrito de Chaozhou, os agricultores a nomearam de “huang long bing”, onde “bing” significa doença, “huang” significa amarelo e “long” significa dragão, logo “doença do dragão amarelo”. Em 1937 foi descrito na África do Sul e, embora tenha sido nomeado na região como “greening”, em 1995 foi oficializado o nome Huanglongbing (HLB) e se tornou amplamente utilizado para as formas africana, americana e asiática da doença (Bové, 2006).

Os agentes associados ao HLB são bactérias gram-negativas do gênero ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. (Laflèche e Bové, 1970; Jagoueix et al., 1994) pertencentes a três espécies: ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (CLaf), ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (CLam) e ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLas), cujos nomes correspondem ao continente em que foram inicialmente relatadas. As Liberibacters levam o termo ‘*Candidatus*’ na nomenclatura até que o postulado de Koch esteja completo, visto que ainda não foi possível isolá-las em meio de cultura (Li et al., 2009).

Quando a doença foi relatada no Brasil em 2004 (Coletta-Filho et al., 2004), havia predominância da bactéria CLam (Teixeira et al., 2005). Porém, atualmente, a maior parte das plantas é infectada por CLas, com 99,9% das amostras positivas do

laboratório de diagnóstico do Fundecitrus, sendo a contaminação por CLam praticamente nula (Bassanezi et al., 2020; Wulff et al., 2021). Essa mudança se deu pois CLas contêm características que conferem a ela maiores vantagens epidemiológicas e competitivas sobre CLam, como maior tolerância a altas temperaturas, maior título bacteriano e facilidade de transmissão (Lopes et al., 2009, 2013; Bassanezi et al., 2020). Ainda não houve relato da presença de CLaf no Brasil.

Tanto CLas quanto CLam são transmitidas no Brasil por um inseto vetor, o psílídeo asiático dos citros *Diaphorina citri* [Hemiptera: (Psyllidae)], que se alimenta principalmente de novas brotações, sugando a seiva do floema (Coletta-Filho et al., 2004; Canale et al., 2017). A bactéria, que é restrita aos vasos do floema, pode ser adquirida pelo inseto vetor em qualquer fase da vida, porém é em sua fase ninfal que a aquisição é mais eficiente e na fase adulta é mais capaz de inocular (Pelz-Stelinski et al., 2010; Ammar et al., 2020). Ao se alimentar de plantas doentes, o psílídeo introduz o estilete no tecido vegetal, atingindo o floema, processo que pode levar até 8 horas (Bonani et al., 2010; Wu et al., 2016; Carmo-Souza et al., 2020), onde a bactéria será adquirida dependendo do estágio de desenvolvimento do tecido vegetal e das condições ambientais (Raiol-Junior et al., 2021; Lopes e Cifuentes-Arenas, 2021; Pandey et al., 2021). Quando adquirida, após duas a três semanas do período de latência, os psílídeos poderão infectar plantas sadias (Canale et al., 2017).

Uma vez que o inseto vetor prefere se alimentar de brotações (Lopes e Cifuentes-Arenas, 2021), ao inocular o tecido jovem, a bactéria permanecerá nesse fluxo até que esteja maduro o suficiente para se transformar em fonte (Pandey et al., 2021; Alves et al., 2021a). Ao ser inserida na planta, acredita-se que, seguindo o fluxo de seiva, a bactéria coloniza primeiramente o sistema radicular, local em que irá se multiplicar, e posteriormente a bactéria colonizará outros órgãos da planta, como folhas, frutos, flores, tegumentos e caules, de forma sistêmica, mas irregular nos tecidos da planta (Kunta et al., 2014; Raiol-Junior et al., 2021).

Como não há evidências de estruturas semelhantes a flagelos, o movimento da bactéria pela seiva do floema é de forma passiva (Hilf et al., 2013; Andrade et al., 2019; De Francesco et al., 2021). O acúmulo da bactéria não é capaz de causar o entupimento dos vasos do floema. Dessa forma, uma das principais alterações anatômicas é que a bactéria induz a formação e deposição de calose, restringindo os

poros da placa crivada, causando disfunção do floema e conseqüentemente provocando o acúmulo excessivo de amido (Machado et al., 2010; Achor et al., 2020).

Os primeiros sintomas visíveis de HLB são caracterizados pelo amarelecimento dos ramos e, nas folhas desses ramos, observa-se o sintoma mais característico da doença que é o "mosqueado" ou clorose assimétrica (Wulff et al., 2021). Em plantas infectadas, é comum observar também sintomas de deficiência nutricional e, em estágios mais avançados da infecção, ocorre desfolha, seca e morte dos ponteiros. Geralmente, os frutos encontrados nos ramos sintomáticos são assimétricos, possuem tamanho reduzido e apresentam escurecimento na columela, além de sementes abortadas e deterioração das características organolépticas, como sabor, aroma e textura (Bové, 2006).

A produtividade de um pomar infectado está diretamente relacionada à severidade dos sintomas e à incidência de plantas com HLB, uma vez que em estágios mais avançados da doença ocorre a queda prematura de frutos, resultando em redução na produção, além dos danos à qualidade mencionados (Belasque-Junior et al., 2009; Bassanezi et al., 2011, 2020). Com os diversos prejuízos causados pelo HLB, há também a redução da longevidade dos pomares de 18 a 25 anos, em pomares saudáveis, para 7 a 10 anos em pomares com a presença da doença (Sulzbach et al., 2017).

Por não existirem métodos curativos, medidas de manejo foram recomendadas e adotadas pelos produtores. Entre essas medidas, estão o uso de mudas sadias produzidas em ambiente protegido e adquiridas de viveiros certificados, a inspeção de plantas para identificar a presença de sintomas da doença, o uso de armadilhas amarelas para detectar a presença do inseto vetor, o uso de produtos químicos e outros tipos de controle para conter a ocorrência do inseto vetor e erradicação de plantas doentes (Bové, 2006; Belasque-Junior et al., 2010a; Bassanezi et al., 2020).

A maior parte das árvores doentes se concentram nas bordas dos pomares. Esse efeito de borda é consequência da migração de psilídeos infecciosos, ou seja, da infecção primária procedente do inóculo produzido fora do pomar. Por isso é muito importante que sejam removidas as árvores sintomáticas e que o controle do inseto vetor, oriundo da infecção primária, seja feito dentro das propriedades, evitando assim

a infecção secundária resultante do inóculo produzido dentro do pomar (Gasparoto et al., 2018).

Para o sucesso do controle da disseminação da doença, as medidas de controle adotadas exigem senso de coletividade entre os citricultores e os proprietários de áreas externas (Bassanezi et al., 2013). É necessário que ambos tomem as medidas preventivas mencionadas acima para que plantas de citros infectadas não sirvam como fontes de inóculo de um local para o outro, tornando o manejo regional do HLB bastante complexo (Bassanezi et al., 2020).

Uma das grandes dificuldades de manejo da doença é o longo período de incubação, que corresponde ao intervalo de inoculação até o surgimento dos sintomas, em relação ao menor período de latência, que representa o intervalo entre a inoculação até a planta ser capaz de transmitir a bactéria (Canale et al., 2020). Em condições experimentais, o surgimento de sintomas varia de quatro a oito meses (Lopes et al., 2009; Canale et al., 2020), já em condições de campo, pode levar até mais de um ano (Gottwald, 2010). Nesse período, plantas assintomáticas servem de inóculo para a disseminação da doença através do inseto vetor.

Além disso, outro fator que influencia na dificuldade do manejo é a dependência do uso do controle químico, por ser a maneira mais eficaz de reduzir as populações do inseto vetor. Porém, pelo uso indevido e a falta de rotação de inseticidas, vem acarretando a seleção de indivíduos resistentes e dificultando o controle do inseto (Miranda et al., 2024).

As medidas necessárias para o controle da doença envolvem tempo, recursos humanos e financeiros, que devem ser realizados com bastante frequência e em escala regional, tornando o manejo muito custoso (Belasque-Junior et al., 2010b). Apesar disso, é extremamente importante que as medidas sejam tomadas. Um exemplo do quanto é essencial que se faça um bom manejo é o caso da Flórida (EUA), que na tentativa de conviver com a doença, tomaram uma série de medidas que visavam curar e reduzir os sintomas do HLB, mas que não foram suficientes para controlar a doença (Bassanezi et al., 2020).

A primeira estimativa oficial da incidência de HLB nos pomares do estado de São Paulo foi realizado no ano de 2008 quando 0,61% das árvores estavam infectadas e com sintomas visuais. Em 2015, a incidência de árvores sintomáticas foi de 17,8%.

Entre 2015 e 2020, os índices permaneceram estáveis na casa de 20-25% devido, principalmente, ao aumento das medidas de controle (Bassanezi et al., 2020). Contudo, informações provenientes das estimativas conduzidas em 2023, revelaram que a incidência média de laranjeiras com sintomas de HLB no cinturão citrícola atingiu índice médio de 38,06% (Fundecitrus, 2023).

Esse aumento a partir da década de 2020 representa um crescimento de 56% na incidência de plantas com sintomas no campo, causado, muito em função da manutenção de laranjeiras doentes nas propriedades sem o devido controle do inseto vetor (Fundecitrus, 2023). A rápida disseminação dessa doença, somada aos danos devastadores que ela causa, coloca a indústria citrícola em sério risco.

2.5 Resistência genética e uso de porta-enxerto como estratégia para o manejo do HLB

A resistência genética em plantas é um mecanismo de defesa primordial permitindo que as plantas resistam às infecções causadas por diversos patógenos. No âmbito biológico, as plantas podem ser classificadas como tolerantes, que se caracterizam pela capacidade de conviver com a presença de um patógeno em seus tecidos sem sofrer impactos econômicos significativos, como também podem ser classificadas como resistentes, que se definem pela habilidade do indivíduo em impedir a multiplicação de um patógeno em seu interior (Amorim et al., 2011).

A maioria das copas cítricas utilizadas comercialmente é muito dependente do uso de porta-enxertos, pois não apresentam características benéficas que competem a elas boa saúde às raízes, como tolerância à salinidade, pH elevado, inundação e resistência a patógenos (Bowman e Joubert, 2020). Historicamente, o uso de porta-enxertos garante a sobrevivência dessas copas, em especial, devido a tolerância ou resistência à diversos patógenos, como *Phytophthora* e CTV (Moreno et al., 2008; Grahlan e Feichtenberger, 2015). Um dos grandes exemplos foi a substituição da laranjeira-azedada, que era suscetível ao CTV, pelo uso do limoeiro 'Cravo', resistente (Müller et al., 2005). E posteriormente a substituição do limoeiro 'Cravo', suscetível ao declínio dos citros e à MSC, para outros porta-enxertos que fossem tolerantes ou

resistentes à essas doenças, tornando possível o convívio com a doença e a manutenção das árvores cítricas (Baldassari et al., 2003; Gimenes-Fernandes e Bassanezi, 2001; Bassanezi et al., 2003).

No caso do patossistema citros x CLas, a resistência genética relacionada à essa bactéria é complexa, pois não há relatos de variedades comerciais do gênero *Citrus* resistentes. Os trabalhos pioneiros para avaliação de resistência genética fundamentavam-se em sintomatologia (Ramadugu et al., 2016). Entretanto, avaliar os níveis de tolerância ou resistência com base apenas nos sintomas visuais de HLB é confuso, pois se assemelham muito com outros sintomas de doenças ou deficiências nutricionais, e podem não se relacionar diretamente à queda e qualidade dos frutos, com muita influência de fatores ambientais (Bové, 2006; Gottwald et al., 2007).

Alguns trabalhos recentes, relataram espécies de *Citrus* e parentes próximos com diversos níveis de resistência e tolerância. Porém, dependendo das condições utilizadas para desafiar as plantas para inoculação de CLas, os níveis de tolerância ou resistência são muito discrepantes (Folimonova et al., 2009; Shokrollah et al., 2009; Feng et al., 2015; Ramadugu et al., 2016; Miles et al., 2017).

Nesses ensaios, algumas seleções de plantas, comumente usadas como porta-enxerto, foram relatadas como tolerantes e/ou resistentes. Em condições de casa de vegetação, *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos foram classificados como parcialmente resistentes por Folimonova et al. (2009), como resistentes por Albrecht e Bowman (2012a) e com diferentes níveis de resistência quando avaliados como pé-franco, em condições de campo, por Ramadugu et al. (2016). Quando enxertados em um porta-enxerto suscetível, foram classificados como suscetíveis, da mesma forma que uma laranjeira-doce (Alves et al., 2021b; 2022).

Recentemente, experimentos avaliados em campo, investigaram o desempenho de copas com diferentes porta-enxertos, com relação à influência e impacto do HLB. Na Flórida, em testes conduzidos em regiões endêmicas de HLB, alguns porta-enxertos induziram melhor desempenho e produtividade na copa (Bowman et al., 2016a, b). No Brasil, alguns porta-enxertos utilizados comercialmente ou com grande potencial agrônômico foram testados e, apesar de serem suscetíveis ao HLB, apresentaram potencial de serem porta-enxertos alternativos (Vitória et al., 2024). Apesar de evidenciarem alguns benefícios, não causaram efeitos positivos

consistentes ou comprovados e não impediram a multiplicação da bactéria na copa da planta de laranjeira-doce.

Na tentativa de buscar alternativas que auxiliem no manejo do HLB, algumas espécies de parentes mais distantes de *Citrus* foram testados e observaram-se muitos indícios de resistência ou até imunidade à CLas (Damsteegt et al., 2010; Beloti et al., 2018; Cifuentes-Arenas et al., 2019; Alves et al., 2021a). Entretanto essas espécies não são compatíveis sexualmente ou por enxertia com *Citrus* (Raiol-Junior et al., 2022), tornando mais difícil as abordagens de utilização desses genótipos em estratégias de mitigação ou manejo da doença.

Devido a importância do setor citrícola e mediante à ameaça do HLB, aliada a dificuldade de manejo que a doença impõe, a resistência se torna um importante objetivo de estudo. Sendo assim, a busca por espécies próximas do gênero *Citrus*, que sejam compatíveis tanto por enxertia, como sexualmente, e que sejam resistentes à CLas, vêm sendo amplamente investigadas (Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021b, 2022).

Ainda não foram publicados trabalhos testando genótipos derivados de limas da Oceania na posição de porta-enxerto. Os ensaios existentes os avaliaram como pé-franco em condições de campo (Ramadugu et al., 2016) ou em condições controladas na posição de copa com um porta-enxerto suscetível (Alves et al., 2021b, 2022). Alguns desses genótipos, bem como seus híbridos, foram classificados como resistentes, abrindo margem para estudos com outras abordagens.

Em razão disso, neste trabalho avaliou-se diferentes acessos potencialmente resistentes à CLas como porta-enxertos de laranjeira-doce. Para tal, o objetivo do estudo foi avaliar os diferentes acessos quanto a movimentação bacteriana via amostragem de copa, caule (de copa e porta-enxerto) e raiz, quanto ao desempenho agrônomo em condições controladas e quanto a expressão diferencial de genes relacionados a mecanismos de defesa. Acredita-se que um porta-enxerto resistente possa reduzir a infecção e colonização pela bactéria e, conseqüentemente, diminuir os danos pelo HLB.

3. Material e Métodos

3.1 Local de execução dos ensaios

O ensaio experimental foi conduzido nas dependências do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) em Araraquara-SP. Durante a experimentação, as plantas foram mantidas em estufas com telados antiafídeos protegidos contra artrópodes vetores com temperatura variando de 7,8 °C a 46,4 °C, com umidade mínima de 20,2% e máxima de 97%, de acordo com os dados registrados no período de janeiro de 2023 até setembro de 2023 (Registrador Eletrônico de Umidade e Temperatura – *Datalogger* – NOVUS), fotoperíodo natural e uso de tela de sombrite para períodos com temperaturas elevadas. As estufas tem estrutura para desinfestação das mãos e dos pés e bancadas para manipulação das plantas.

Durante o período de experimentação, as plantas foram irrigadas de duas a três vezes por semana, de acordo com a necessidade. Além disso, as plantas foram fertirrigadas uma vez por semana com uma solução nutritiva contendo 400 g de nitrato de cálcio, 600 g de sulfato de magnésio, 144 g de nitrato de potássio, 38 g de mono amônio fosfato (MAP), 2,7 g de ferro EDDHA, 3,12 g de cobre EDTA, 0,72 g de zinco EDTA, 0,54 g de manganês EDTA, 2,1 g ácido bórico 0,36 g de molibdato de sódio e 40 mL por 1000 L de solução. Onde para ferro, cobre, zinco e manganês as concentrações foram dos elementos em solução, para os demais, as concentrações foram dos fertilizantes em solução e o pH da solução foi ajustado para que ficasse próximo de 5,5.

Além disso, as plantas foram pulverizadas contra insetos e ácaros a cada 21 dias, geralmente utilizando um inseticida junto de um acaricida com adição de óleo mineral, rotacionando os modos de ação dos defensivos. A escolha dos defensivos utilizados levou-se em conta a ocorrência do inseto/ácaro e o histórico de aplicações.

3.2 Material vegetal

Para a condução do experimento, foram selecionados diferentes genótipos, previamente caracterizados como resistentes à CLas na posição de copa (Alves et al., 2021b, 2022), para serem avaliados, neste trabalho, na posição de porta-enxerto:

híbrido BGC682 {[*E. glauca* × (*M. australis* × *M. australasica*)] × *M. australasica*}, híbrido BGC695 [*M. australasica* × (*M. australis* × *M. australasica*)] e um híbrido de *M. australis* × *M. inodora* (Alves et al., 2022). Levando em consideração o fato de que esses genótipos são monoembriônicos ou não produzem sementes até o momento, a propagação dos porta-enxertos foi realizada previamente por estaquia. O porta-enxerto suscetível a CLas e utilizado como controle foram plantas de citrumelo Swingle [*C. paradisi* MacFad cv. Duncan × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] propagadas por semente como padrão comercial desse porta-enxerto.

3.2.1 Delineamento experimental

Como citado anteriormente, alguns genótipos de espécies da Oceania são monoembriônicos ou não produzem sementes. Portanto, com o intuito de viabilizar estudos com esses genótipos, foram conduzidos ensaios (dados não publicados) testando diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (IBA com 99% de pureza) em casca de pinus, para verificar a efetividade de propagação via estaquia, bem como propagar esses genótipos para uso neste experimento e pesquisas posteriores.

As plantas matrizes doadoras das estacas são mantidas na coleção do Fundecitrus em ambiente protegido em casa de vegetação. Então, para o teste de propagação dos genótipos, foram retiradas estacas dessas plantas matrizes, de seções de galhos maduros (quatro a seis meses de idade), com aproximadamente 10 a 12 centímetros de comprimento.

Para a preparação das estacas, foram cortadas, a parte inferior, em formato de bisel e na extremidade foram deixadas duas folhas cortadas para reduzir o tamanho em cerca de 30 a 40% de sua área original. As estacas foram lavadas com solução de cloro na concentração de 1% para assepsia. A parte basal de cada estaca foi imersa no IBA, durante 5s, imersão rápida e, posteriormente, submetida ao substrato, inserindo aproximadamente dois centímetros da estaca, de modo que permitisse que a base da folha e um nó permanecessem acima da superfície do substrato. Além disso, foi criada uma câmara úmida para favorecer o enraizamento.

Como controle, foi utilizado limoeiro Cravo (*Citrus* × *limonia*), sendo que em todos os ensaios realizados o limoeiro Cravo obteve 100% das estacas enraizadas,

enquanto para os demais genótipos avaliados as proporções variaram de 10 a 60% de estacas enraizadas em relação ao número de estacas testadas nos diferentes ensaios, evidenciando a dificuldade de propagação desses híbridos.

Para a propagação dos porta-enxertos utilizados neste estudo utilizamos os genótipos que obtiveram uma taxa média de 60% de enraizamento em dois lotes. O primeiro lote foi enraizado em setembro de 2019 e transplantado para sacolas de 20x15 cm com substrato de pinus em fevereiro de 2020. O segundo lote foi enraizado em agosto de 2020 e transplantado para sacolas de 20x15 cm com substrato de pinus em janeiro de 2021.

Quando as estacas atingiram aproximadamente 8 mm de diâmetro, foram submetidas à enxertia de copas com borbulhas de laranjeira-doce 'Valência' provenientes de plantas matrizes. A enxertia foi realizada entre os meses de janeiro e março de 2022, sendo necessário realizar enxertias sucessivas, devido ao pegamento menor que 50% sobre os genótipos híbridos.

Após o desenvolvimento da copa, que se deu aproximadamente 10 meses após a enxertia, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2023, as copas foram podadas para estimular a brotação para a inoculação via psílídeos infectivos criados em plantas fontes de CLas (plantas infectadas com CLas e com alto título bacteriano). As plantas foram conduzidas com crescimento livre e, só foram podadas para a inoculação de CLas e aos 6 e 12 MAI para induzir brotação para a avaliação de expressão relativa de um grupo selecionado de genes de defesa.

Devido a disponibilidade dos genótipos propagados e da quantidade de plantas enxertadas com sucesso, para cada combinação copa/porta-enxerto, foram avaliadas quantidades distintas de plantas, sendo:

- Swingle [*C. paradisi* MacFad cv. Duncan × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] (controle absoluto): 7 plantas não inoculadas e 7 plantas inoculadas.

- Híbrido de *M. australis* × *M. inodora*: 9 plantas não inoculadas e 25 plantas inoculadas.

- Híbrido BGC682 {[*E. glauca* × (*M. australis* × *M. australasica*)] × *M. australasica*}: 4 plantas não inoculadas e 9 plantas inoculadas.

- Híbrido BGC695 [*M. australasica* × (*M. australis* × *M. australasica*)]: 6 plantas não inoculadas e 22 plantas inoculadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2 (porta-enxerto x inoculação de CLas).

3.3 Criação de psílídeos infectivos e inoculação de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

A inoculação de CLas nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto avaliadas, foi feita via psílídeos criados em plantas fontes de CLas, conforme procedimentos descritos por Lopes & Cifuentes-Arenas (2021). Os psílídeos utilizados para criação de insetos infectivos, foram insetos sadios e livres de CLas, criados em murta, oriundos da colônia estoque de *D. citri*, mantida no Fundecitrus.

Para a criação dos insetos infectivos, inicialmente, as plantas fontes CLas foram transferidas da estufa para uma sala climatizada com temperatura constante de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa de $60\% \pm 10$, e fotoperíodo de 12 h D:N e radiação $250\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Posteriormente, as copas das plantas fontes CLas foram podadas para indução de novos fluxos vegetativos (brotos). Quando esses fluxos vegetativos atingiram os estádios de desenvolvimento V2/V3 (Cifuentes-Arenas et al., 2018), utilizando tecido tipo “tule” em formato de saco medindo 50 x 35 cm, foram confinados quatro psílídeos (sadios, adultos e acasalados, com 15-20 dias de idade) por broto, por sete dias, para acesso a oviposição. Após esse período, os insetos foram retirados das plantas e descartados. As plantas foram mantidas na sala climatizada até a emergência de novos adultos. Em seguida, esses adultos (F1) recém-emergidos foram mantidos nas plantas por 20 dias para a superação da latência de CLas (Canale et al., 2017).

A partir da emergência dos primeiros insetos adultos, as diferentes combinações de copa e porta-enxertos selecionadas para inoculação foram transferidas da estufa para a sala com ambiente climatizado ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, $60\% \pm 10$ UR, fotoperíodo de 12 h e radiação de $250\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e foram podadas para estimular a brotação. Ao mesmo tempo, as plantas selecionadas como controle negativo, foram transferidas da estufa para outra sala com ambiente climatizado, nas mesmas condições citadas acima, e foram podadas para estimular a brotação.

Quando as novas brotações do material a ser inoculado atingiram o estágio vegetativo V2/V3, com aproximadamente 5 a 10 cm de comprimento, em cada planta, foi selecionado um broto. Em cada broto selecionado foram confinados cinco psilídeos F1 obtidos da criação em plantas fontes de CLas. Os psilídeos foram mantidos nas plantas para o acesso a inoculação durante sete dias e, para o confinamento, foi utilizado tecido tipo “tule” em formato de saco medindo 20 x 15 cm, cobrindo somente o broto, para aumentar as chances de inoculação. Nas plantas utilizadas como controle, foram confinados insetos sadios, oriundos da colônia estoque, com aproximadamente 20 dias de idade.

Após os sete dias de confinamento, foi feita uma amostragem aleatória, de um psilídeo por planta confinada, para determinar a porcentagem de insetos infectados com CLas (Li et al., 2006; Manjunath et al., 2008). Em seguida, os outros insetos confinados, foram removidos e descartados. Depois do período de acesso à inoculação dos psilídeos, as plantas foram mantidas por duas semanas em ambiente climatizado e após esse período, foram pulverizadas com inseticida e transferidas novamente para a estufa.

3.4 Amostragem das plantas

A colonização e movimentação de CLas nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto foi avaliada mediante o monitoramento da titulação bacteriana a partir do DNA extraído de amostras coletadas em diferentes tecidos das plantas infectadas (folhas da copa, casca da copa, casca do porta-enxerto e raízes).

A primeira amostragem foi realizada aos 6 meses após o confinamento dos psilídeos infectivos (MAI), em setembro de 2023. Nessa avaliação priorizou-se somente a amostragem de folhas recém-emergidas da copa para confirmar a infecção pela bactéria, uma vez que a translocação de CLas ocorre através do fluxo do floema, de forma sistêmica e há maiores chances de detecção da bactéria em direção aos novos tecidos em crescimento (Raiol Junior et al., 2021). A segunda amostragem foi realizada aos 12 MAI, em março de 2024, através da coleta de folhas recém-emergidas da copa, casca do caule da copa e do porta-enxerto e raízes do porta-enxerto, para avaliar o deslocamento da bactéria.

Para a amostragem das folhas, foram coletadas de cada planta amostras individuais de três a quatro folhas recém-emergidas da copa. Para amostragem da casca da copa e do porta-enxerto, com o auxílio de um bisturi, foi coletado um pedaço de casca com aproximadamente 1 cm de cada planta, a 5 cm acima da linha de enxertia (casca da copa) e 5 cm abaixo da linha de enxertia (casca do porta-enxerto), tomando o cuidado de coletar apenas em metade do caule para não interromper o fluxo de seiva da planta. Para a amostragem das raízes, utilizando uma bandeja, o torrão foi retirado da sacola e com um bisturi, foram coletadas as raízes mais novas ao redor do sistema radicular. Em média cinco pedaços foram coletados e imediatamente lavados com água corrente para remoção do substrato, para evitar impurezas no momento da extração do DNA vegetal.

3.5 Extração do DNA vegetal e detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

Antes do início do processo de preparo das amostras, as folhas de cada combinação de copa e porta-enxerto foram fotografadas para observação dos sintomas e comparação com os resultados da qPCR.

Para folhas e raízes, foram utilizados aproximadamente 200 mg de tecido vegetal. Para as amostras de casca, foram utilizados aproximadamente 100 mg de tecido vegetal. Todas as amostras foram picadas com o auxílio de lâminas em aço inoxidável e, em seguida, foram acondicionadas em microtubos com fundo em U de 2,0 mL. Após o preparo, as amostras foram congeladas a -20 °C até as etapas posteriores.

No momento da extração, em cada microtubo contendo amostras de tecido vegetal, foram adicionadas uma esfera metálica (6 mm de diâmetro) e as amostras foram trituradas 2 x por 45 s a 30 Hz com o auxílio do equipamento Tissue Lyzer (Qiagen). O DNA foi extraído pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), conforme descrito por Murray e Thompson (1980), com adaptações: após a trituração, em cada amostra de folha, casca e raiz foram adicionados 1 mL do tampão CTAB (acrescido de 0,2% de β -mercaptoetanol). As amostras foram mantidas em banho-maria por 30 min a 65 °C e, em seguida, cada amostra de folha, casca e raiz recebeu 0,7 mL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v: v). As amostras foram então

centrifugadas (12.000 rpm, 5 min, 24 °C) e recuperou-se 0,5 mL do sobrenadante que foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL contendo 0,3 mL de álcool isopropílico e, posteriormente, armazenadas por 30 min a -20 °C. Depois as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm, 20 min, 4 °C) e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70 %, seguido de centrifugação (12.000 rpm, 10 min, 4 °C). Por fim, o precipitado foi seco e ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q. Todas as amostras foram armazenadas a - 20 °C até análises posteriores.

A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000). As plantas inoculadas foram analisadas individualmente quanto à presença de CLas por qPCR de acordo com Zheng et al. (2016). Nas reações, foram utilizados o Kit TaqMan qPCR Master Mix (Ambion/ThermoFisher Scientific) e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a detecção da região *nrdB* (subunidades β de ribonucleotídeo redutase) de CLas (RNRf/RNRr) e sonda FAM (5'FAM/3'BHQ1, Macrogen, Seul, Coréia do Sul) com o seguinte programa para amplificação do DNA: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s (Zheng et al., 2016).

Para cada ciclo de extração, também foi extraído o DNA de uma amostra interna de folha sadia (livre de CLas) de laranjeira-doce. Para cada reação de qPCR foram adicionados uma amostra do controle sadio da extração (livre de CLas), um controle interno positivo para CLas, um controle interno negativo e um poço apenas com os reagentes utilizados nas reações (*'no template control'*- NTC). Para a avaliação do título de CLas, foram assumidos como positivos os valores de Ct (*Cycle threshold*) $\leq 35,0$, valor limite estabelecido pelo laboratório do Fundecitrus.

3.6 Caracterização biométrica das diferentes combinações copa/porta-enxerto e matéria seca das raízes

Na biometria das plantas, foram medidos a altura de enxertia, o diâmetro do caule de copa e porta-enxerto cinco centímetros acima e abaixo da enxertia, o comprimento do enxerto e o número de fluxos vegetativos após a poda. Para a medida de altura da enxertia e o comprimento do enxerto foi utilizada uma trena de cinco

metros e para a medida dos diâmetros foi utilizado um paquímetro digital. Esses dados foram coletados no momento da inoculação (tempo zero) e aos 6 e 12 MAI.

Ao final do experimento, a massa de matéria seca de raízes foi quantificada, pois é um importante indicador para avaliar danos pelo HLB, uma vez que árvores afetadas apresentam deterioração significativa do sistema radicular (Johnson et al., 2014). Para tal, as plantas foram retiradas da sacola e uma parte do substrato foi removida. Para a remoção total do substrato e lavagem, o sistema radicular foi separado da planta utilizando uma tesoura de poda e, posteriormente, foi submerso em um balde com água. Em sistemas radiculares onde a remoção do substrato era mais dificultosa, foi utilizada uma mangueira com água corrente para facilitar o processo. Após esse procedimento, o sistema radicular de cada planta foi armazenado em sacos de papel *Kraft* e pesados em balança de precisão. Foram colocados em estufa por 72 horas a 60 °C e depois desse período foram novamente pesados para obtenção dos dados de massa de matéria seca de raiz.

3.7 Avaliação visual de compatibilidade de enxertia e sintomas de CTV

Também, ao final do experimento, as plantas foram avaliadas quanto a compatibilidade da enxertia, observando a linha entre a copa e o porta-enxerto. Também foram observados sintomas de CTV, pela presença de caneluras ao longo do caule. A avaliação de CTV se fez necessária, pois, ao longo deste e de outros estudos que vem sido conduzidos com os diferentes genótipos da Oceania, tem se observado diferentes graus de suscetibilidade ao CTV (Smith et al., 2024). Por isso, neste trabalho avaliamos a presença de sintomas visuais de CTV através da escala de notas estabelecida por Meissner Filho et al. (2002).

Para isso, os caules das plantas foram separados, com o uso de uma tesoura de poda, na medida de cinco centímetros acima da linha de enxertia até a base do sistema radicular. Cada caule foi colocado em um saco plástico contendo um pedaço de folha sulfite, com a identificação da respectiva planta escrita a lápis. Em seguida foram autoclavadas durante 20 minutos para facilitar a retirada da casca. Seguidamente foram atribuídas notas, quanto a presença de caneluras características do CTV, seguindo a escala de notas de Meissner Filho et al., (2002), sendo que foram

atribuídas as seguintes notas: 1 = ausência de caneluras, 2 = presença de caneluras esparsas, 3 = número intermediário de caneluras, 4 = várias caneluras superficiais ou poucas caneluras profundas e 5 = toda superfície do ramo coberta por caneluras superficiais ou profundas.

3.8 Análises de expressão relativa

3.8.1 Amostragem das plantas

A amostragem das plantas para a análise da expressão diferencial das diferentes combinações copa/porta-enxerto à infecção por CLas, de um grupo de alvos relacionados com o sistema de defesa de plantas, foi feita 48 horas após inoculação e aos 12 MAI, com base na dinâmica populacional da multiplicação de CLas após alimentação de psíldeos em genótipos suscetíveis e resistentes, conforme descrito por Alves et al. (2021a).

Para tal, utilizando luvas para evitar a degradação de RNA, 48 horas após inoculação foram coletadas amostras de tecido de brotações dos mesmos brotos confinados para inoculação. E aos 12 MAI as plantas foram podadas para estimular a emissão de novos fluxos vegetativos, e quando esses fluxos atingiram o estágio vegetativo V2/V3 (Cifuentes-Arenas et al., 2018) foram coletados. Em ambos os períodos, foram coletadas da copa de cada planta três amostras da combinação copa/porta-enxerto 'Valencia'/Swingle sadio (como controle absoluto) e três amostras de cada uma das outras combinações de copa/porta-enxerto CLas-positivas como réplicas biológicas. Todas as amostras, ao serem coletadas, foram imediatamente colocadas em microtubos (2,0 mL), congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até as próximas etapas do trabalho.

3.8.2 Extração do RNA

A extração de RNA total das amostras coletadas foi realizada pelo método RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, com adaptações. Todos os procedimentos foram realizados utilizando luvas para evitar a

degradação do RNA. Foram preparados microtubos com formato em U de 2,0 mL, os identificando com a respectiva amostra e acrescentando uma esfera metálica (6 mm de diâmetro). Os microtubos preparados foram colocados em rack (estante plástica para microtubos), dentro de um isopor contendo nitrogênio líquido, e aproximadamente 0,1 g das amostras, coletadas anteriormente, foram retiradas do ultrafreezer e transferidas imediatamente para os microtubos.

Antes de iniciar a extração de RNA, foram adicionados 4 volumes de etanol (96-100%) ao Buffer RPE para ter a solução de trabalho. Além disso, foram adicionados 10 μ L de β -mercaptoethanol para 1 mL de Buffer de lise RLT, preparando a quantidade suficiente para adicionar às amostras. As amostras acondicionadas em nitrogênio líquido foram retiradas do nitrogênio líquido e rapidamente levadas para serem trituradas 1 x por 45 s a 30 Hz com o auxílio do equipamento Tissue Lyzer (Qiagen). Todo o procedimento posterior foi realizado com as amostras em um isopor com gelo. Depois de trituradas foram centrifugadas instantaneamente para que o tecido fosse para o fundo do microtubo. Para cada amostra foram adicionados 450 μ L de Buffer RLT, preparado anteriormente com β -mercaptoethanol, e vortexadas vigorosamente. O conteúdo foi transferido para uma coluna *QIAshredder (lilac)* encaixado em um tubo de coleta de 2 mL e centrifugadas por dois minutos a rotação máxima (12.000 rpm). Após, sem perturbar as amostras, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 0,5 volumes de etanol (96-100%) ao lisado claro, homogeneizando imediatamente com a pipeta. Em seguida, todo o conteúdo, com qualquer precipitado, foi transferido para a coluna [*RNeasy Mini spin column (pink)*] encaixado em um microtubo de coleta de 2 mL e centrifugados por 15 segundos a 12.000 rpm. Foram adicionados 700 μ L do Buffer RW1 na coluna [*RNeasy Mini spin column (pink)*] e centrifugados por 20 segundos a 12.000 rpm e depois o líquido que passou pela coluna foi descartado. Foram adicionados 500 μ L, duas vezes, do Buffer RPE na coluna [*RNeasy Mini spin column (pink)*] e centrifugados por 20 segundos e dois minutos, respectivamente, na rotação de 12.000 rpm e depois novamente o líquido que passou pela coluna foi descartado. Como etapa adicional, as amostras foram transferidas para microtubos de coleta de 2 mL e centrifugados por dois minutos para secagem total da membrana. Na última etapa do processo, foram adicionados 20 μ L de água livre de nucleases diretamente

a membrana, incubados por três minutos e centrifugados por um minuto na rotação de 12.000 rpm para eluir o RNA, repetindo o procedimento mais duas vezes com uma incubação de três minutos e outra incubação de cinco minutos, totalizando 60 µL de água livre de nucleases. A quantidade e qualidade do RNA extraído foi verificada por espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Fischer) e a integridade por eletroforese em gel de agarose (1,5%). Posteriormente, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até as próximas etapas do trabalho.

3.8.3 Tratamento com DNase e síntese do cDNA

O tratamento das amostras para eliminação de resíduos de DNA foi feito com a enzima Turbo DNase RNA free (Thermo Fischer Scientific) e a síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit 'SuperScript IV' (Thermo Fischer Scientific), em ambas as etapas os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. O reagente SYBR green (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado nas reações de RT-qPCR, seguindo as recomendações do fabricante e com os pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers) selecionados e genes de referência. Para cada alvo, foram avaliadas três réplicas biológicas por tratamento e as reações foram feitas em triplicata. Para os cálculos de expressão relativa foi empregado o método $2(-\Delta\Delta Ct)$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os endógenos GAPC2 (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e ACT (Actina 2) foram utilizados como normalizadores (Mafra et al., 2012; Carvalho et al., 2010).

3.8.4 Seleção dos alvos para os ensaios de expressão genica

Para o estudo da expressão gênica das diferentes combinações de copa e porta-enxerto e após a infecção com CLas, foram avaliadas a expressão de genes relacionados à resposta de defesa, regulação da patogênese e ao estresse em plantas com HLB, a partir de alvos já validados e disponíveis na literatura (Tabela 1).

Os alvos WRKY70 e WRKY25 são membros do fator de transcrição do grupo WRKY, importantes ativadores de genes de defesa modulando a tolerância ao

estresse abiótico e biótico em plantas (Mafra et al., 2013; Nakandala et al., 2024). O alvo RLP7 faz parte do grupo de proteínas da família de resistência a doenças (Mafra et al., 2013), os RLPs (do inglês *receptor-like proteins*), são receptores de superfície celular (Wang et al., 2008). O alvo USP (proteína de estresse universal) é um importante mecanismo de defesa encontrado em uma ampla variedade de organismos (Chi et al., 2019). Os alvos GSL1 e GSL5 estão relacionados à deposição de calose (Oliveira et al., 2019), uma resposta de defesa à presença da bactéria, causando entupimento dos vasos do floema (Machado et al., 2010; Achor et al., 2020). O alvo NPR1 é um receptor de ácido salicílico e está relacionado à patogênese 1 sendo um regulador chave para a indução de resistência sistêmica adquirida (Dutt et al., 2016; Oliveira et al., 2019). E o alvo PR2 é um gene chave para indução de resposta ao ataque de patógenos em plantas (van-Loon, 1985; Francis et al., 2009; Lally et al., 2021).

Tabela 1. Regiões alvo previamente selecionadas para ensaios RT-qPCR e expressão relativa.

Gene	Anotação	Sequência (5' - 3')	Referência
<i>Endógenos</i>			
GAPC2	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2	TCTTGCCTGCTTTGAATGGA	Mafra et al., 2012
		TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT	
ACT	Actina-2	CCCTTCCTCATGCCATTCTTC	Mafra et al., 2012
		CGGCTGTGGTGGTAAACATGT	
<i>Alvos</i>			
WRKY70	Fator de transcrição WRKY70	TCAGCAGCAGCAGGCCGAATTCTT	Mafra et al., 2013
		GTCCTTCGCCGCCGGTCTCT	
WRKY25	Fator de transcrição WRKY25	GGGCATCGGCAGTGGCTCATC	Mafra et al., 2013
		GCCGCTGCCCTGCAACATTTTC	
RLP7	Proteína da família de resistência a doenças	GGCTCAACGGCACCATTCCA	Mafra et al., 2013
		TGAGGGATCGCTCCTCCGAGTT	
USP	Proteína Universal de estresse	GCAGTGGGCTGCAGATAACGT	Mafra et al., 2013
		CCAGAGCTGCTGCTCGCCTT	
GSL1	Calose sintetase	CCCAAGTATTCCGGCCCTTT	Oliveira et al., 2019
		CACGGGGGTCAAGACAATCA	
GSL5	Calose sintetase	CAGGTGTATGGGCAGCAGAA	Oliveira et al., 2019
		CATCCCTCCCCAAGTGAACC	
NPR1	Não expressor de genes PR 1	TGTAATCTTGTTTAAATGAGCCTCTTG	Oliveira et al., 2019
		TGCAGCCTTAGTGAGCCGCT	
PR2	Proteína relacionada à patogênese 2	TTCCACTGCCATCGAAACTG	Francis et al., 2009
		TGTAATCTTGTTTAAATGAGCCTCTTG	

3.9 Análise dos dados

Ao final dos experimentos, os dados foram analisados quanto aos pressupostos estatísticos. As variáveis biométricas, taxa de infecção de copa e de raiz e título

bacteriano (Ct) em diferentes tecidos vegetais foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias dos contrastes (inoculados ou não) e as médias dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2019). Para a variável biométrica “massa seca de raiz” as médias dos contrastes (inoculados ou não) e as médias dos genótipos foram comparadas pelo teste t de Student utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2019). Dados referentes à expressão relativa foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias dos contrastes (expressão relativa das combinações copa/porta-enxerto inoculadas em relação ao controle absoluto sadio) foram comparadas dentro dos tempos por Tukey ($p \leq 0,05$) e para as mesmas combinações copa/porta-enxerto as 48h ou 12m após a infecção pelo teste de t de Student ($p \leq 0,05$) utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.0 (Windows GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Resultados

4.1. Biometria das diferentes combinações de copa e porta-enxerto momento da inoculação com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

Na avaliação biométrica antes da inoculação não foi realizada a medição das plantas controle. Em relação ao número de ramos na copa de laranjeira 'Valência', a combinação com BGC695 (2,16) diferiu estatisticamente de *M. australis* x *M. inodora* (1,42), enquanto que BGC682 (1,69) apresentou valores intermediários e não diferiu de BGC695 e *M. australis* x *M. inodora* (Tabela 2).

A combinação de laranjeira 'Valência' sobre BGC695 (Altura – 56,69 cm; diâmetro porta-enxerto – 9,23 mm; diâmetro de copa – 5,56 mm) teve um desenvolvimento superior que os demais grupos, com altura de copa, diâmetro de porta-enxerto e diâmetro de copa maiores que BGC682 e *M. australis* x *M. inodora* (Altura – 28,00 e 26,17 cm; diâmetro porta-enxerto – 6,61 e 6,10 mm; diâmetro de copa – 4,35 e 4,22 mm, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2. Biometria de mudas de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada sobre diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao huanglongbing no momento da inoculação com ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’.

Porta-enxerto	Número de ramos na copa			Altura da copa (cm)		
	LV não inoculadas					
Citrumelo Swingle	- ¹			-		
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	1,42	±0,12	b	26,17	±1,64	b
BGC682	1,69	±0,21	ab	28,00	±2,69	b
BGC695	2,16	±0,14	a	56,69	±2,58	a

Porta-enxerto	Diâmetro do PE (mm)			Diâmetro da copa (mm)		
	LV não inoculadas					
Citrumelo Swingle	-			-		
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	6,10	±0,18	b	4,22	±0,13	b
BGC682	6,61	±0,48	b	4,35	±0,21	b
BGC695	9,23	±0,33	a	5,56	±0,20	a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

¹ (-) não avaliado

LV= laranjeira-doce ‘Valência’; PE= porta-enxerto.

4.2 Biometria das diferentes combinações de copa e porta-enxerto aos 6 meses após a infecção.

Aos 6 meses após a infecção (MAI), avaliou-se novamente a biometria das plantas, nessa avaliação foi incluído o controle de citrumelo ‘Swingle’. A avaliação de altura do porta-enxerto, que indica a altura em que foi realizada a enxertia, só foi feita aos 6 MAI. Para este parâmetro, não observamos diferença estatística entre as plantas não inoculadas e as inoculadas para quaisquer dos genótipos (Tabela 3). Já quando comparamos as diferentes espécies, houve maior a altura de enxertia de *M. australis* × *M. inodora* nas plantas inoculadas (30,77 cm) e nas não inoculadas só observamos diferença de *M. australis* × *M. inodora* (26,94 cm) em relação ao BGC695 (12,42 cm) (Tabela 3).

Tabela 3. Altura do porta-enxerto de mudas de laranjeira-doce 'Valência' enxertada em diferentes porta-enxertos originários de híbridos da Oceania potencialmente resistentes ao huanglongbing aos 6 meses após a inoculação de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.

Porta-enxerto	Altura do PE (cm) - 6 MAI					
	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	14,57	±0,95	Aab ¹	14,00	±0,86	Ab
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	26,94	±1,83	Aa	30,77	±5,41	Aa
BGC682	21,75	±3,60	Aab	15,90	±2,45	Ab
BGC695	12,42	±1,27	Ab	12,25	±0,48	Ab

¹ Médias seguidas pela mesma letra (letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas nas colunas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

LV= laranjeira-doce 'Valência'; PE= porta-enxerto.

Não houve diferença significativa entre os genótipos em relação ao número de ramos emitidos na copa, independente da inoculação com CLAs. Para as copas de laranjeira-doce 'Valência' não inoculadas, os porta-enxertos Swingle, *M. australis* × *M. inodora*, BGC682 e BGC695, obtiveram médias de 3,43, 4,00, 2,00 e 2,67 respectivamente e para inoculadas obtiveram 3,83, 3,08, 2,80 e 2,33 respectivamente (Tabela 4).

Aos 6 MAI, o desenvolvimento de altura da copa não foi influenciado pela presença de CLAs. Nas plantas não inoculadas, cujos híbridos *M. australis* × *M. inodora* (34,89 cm) e BGC682 (24,88 cm) como porta-enxerto apresentaram altura menor que os demais genótipos e Swingle (119,57 cm) foi superior ao híbrido BGC695 (77,50 cm). Já nas plantas inoculadas, *M. australis* × *M. inodora* (35,46 cm) e BGC682 (30,10 cm) também apresentaram porte menor. Swingle (109,33 cm), apesar de ser maior que BGC695 (86,14 cm), não diferiu estatisticamente (Tabela 4).

O diâmetro de caule de porta-enxerto também não sofreu influência da infecção por CLAs, onde o diâmetro médio de Swingle foi de 19,28 mm para não inoculadas e 18,69 mm para inoculadas, sendo maior em relação as demais combinações copa/PE avaliadas: BGC695 (11,39 mm para não inoculadas e 11,22 mm para inoculadas), ficando num nível intermediário; e BGC682 (7,29 mm para não inoculadas e 7,69 mm para inoculadas) e *M. australis* × *M. inodora* (6,80 mm para não inoculadas e 6,83 mm para inoculadas) foram semelhantes entre si (Tabela 4).

O diâmetro de caule de copa de plantas compostas por Swingle como PE apresentou diferença significativa entre as plantas inoculadas e não inoculadas, apesar da média das inoculadas (16,22 mm) ter sido maior que a das não inoculadas (14,68 mm). Comparando os genótipos, nas plantas não inoculadas somente aquelas enxertadas sobre Swingle apresentaram diferença apresentando diâmetro maior que os demais genótipos avaliados. Nas plantas inoculadas, em laranjeira-doce 'Valência' sobre BGC695 (7,87 mm) o diâmetro de caule foi maior, quando comparado com *M. australis* × *M. inodora* (5,58 mm) e BGC682 (5,75 mm). Já citrumelo Swingle (16,22 mm), por sua vez, foi maior em relação aos demais genótipos avaliados (Tabela 4).

Tabela 4. Biometria de mudas de laranja-doce ‘Valência’ enxertada em diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao Huanglongbing aos 6 meses após a infecção com ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’.

Número de ramos na copa						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	3,43	±0,43	Aa	3,83	±0,48	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	4,00	±0,75	Aa	3,08	±0,46	Aa
BGC682	2,00	±0,41	Aa	2,80	±0,37	Aa
BGC695	2,67	±0,49	Aa	2,33	±0,21	Aa

Altura da copa (cm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	119,57	±13,21	Aa	109,33	±11,12	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	34,89	±3,05	Ac	35,46	±3,06	Ab
BGC682	24,88	±5,81	Ac	30,10	±6,55	Ab
BGC695	77,50	±3,46	Ab	86,14	±3,46	Aa

Diâmetro do PE (mm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	19,28	±1,01	Aa	18,69	±0,40	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	6,80	±0,41	Ac	6,83	±0,26	Ac
BGC682	7,29	±0,71	Ac	7,69	±1,32	Ac
BGC695	11,39	±0,90	Ab	11,22	±0,47	Ab

Diâmetro da copa (mm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	14,68	±0,68	Ba	16,22	±0,47	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	5,73	±0,20	Ab	5,58	±0,32	Ac
BGC682	6,09	±0,44	Ab	5,75	±0,43	Ac
BGC695	7,39	±0,45	Ab	7,87	±0,26	Ab

Médias seguidas pela mesma letra (letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas nas colunas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

LV= laranja-doce ‘Valência’; PE= porta-enxerto.

4.3 Taxa de infecção e título de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ aos 6 meses após a infecção.

Aos 6 meses após a infecção (MAI), o sucesso da inoculação de CLas via psilídeos foi determinado pela avaliação de amostras de DNA das folhas das copas de laranja-doce ‘Valência’ por qPCR (Zheng et al., 2016). Observou-se que a taxa de infecção das plantas foi superior em laranja-doce ‘Valência’ sobre os porta-

enxertos citrumelo Swingle e BGC695, onde 86% (6 de 7 plantas confinadas) e 82% (18 de 22 plantas confinadas) das copas foram infectadas pela bactéria, respectivamente. Já as copas de laranjeira 'Valência' sobre os porta-enxertos *M. australis* × *M. inodora* (52%, 13 de 25 plantas confinadas) e BGC682 (56%, cinco de 9 plantas confinadas), tiveram, em média, pouco mais da metade das plantas infectadas (Tabela 5).

Com relação ao título bacteriano nas plantas infectadas, as médias de Ct foram equivalentes em todas as combinações de enxertia, ficando próximas de 20,0 (20,6 para Swingle, 21,5 para *M. australis* × *M. inodora*, 23,3 para BGC682 e 23,6 para BGC695) (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de infecção e título bacteriano em folhas da copa de mudas de laranjeira-doce 'Valência' enxertada em diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao huanglongbing aos 6 meses após a infecção com *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Porta-enxerto	Folha da copa - 6 MAI					
	LV não inoculadas		LV inoculadas		% ³	
	Freq. ¹	Ct	Freq. ²	Ct		
Citrumelo Swingle	7/7	nd	6/7	20,6 ±0,6	a	86%
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	9/9	nd	13/25	21,5 ±0,6	a	52%
BGC682	4/4	nd	5/9	23,3 ±0,9	a	56%
BGC695	6/6	nd	18/22	23,6 ±0,8	a	82%

¹ Frequência de plantas negativas/total de plantas controle;

² Frequência de plantas positivas/total de plantas inoculadas;

³ % de inoculação;

Ct = Cycle threshold; nd = não detectado; LV= laranjeira-doce 'Valência'.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (p ≤0,05).

4.4 Biometria das diferentes combinações de copa/porta-enxerto aos 12 meses após a infecção com *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Aos 12 meses após a infecção (MAI), o número de fluxos vegetativos das copas de laranjeira-doce 'Valência' foi maior nas plantas saudáveis enxertadas em citrumelo Swingle (4,86 para Swingle e 3,17, 2,78 e 2,75 para BGC695, *M. australis* × *M. inodora* e BGC682, respectivamente). Nas plantas infectadas com CLAs, o maior número de fluxos vegetativos foi em plantas sobre o porta-enxerto Swingle (4,17) e o menor em

BGC682 (2,20), enquanto BGC695 (3,00) e *M. australis* × *M. inodora* (3,15) não se diferenciaram estatisticamente de nenhum dos genótipos (Tabela 6).

Novamente, a altura da copa não foi influenciada pela presença da bactéria e, em ambas as condições, inoculadas ou não, o porta-enxerto Swingle (119,14 cm para não inoculadas e 121,83 cm para inoculadas) induziu a maior média de altura à copa de laranjeira 'Valência', seguido de BGC695 (71,50 cm para não inoculadas e 84,22 cm para inoculadas). As copas de laranjeira-doce 'Valência' sobre os porta-enxertos *M. australis* × *M. inodora* (40,89 cm para não inoculadas e 36,31 cm para inoculadas) e BGC682 (22,00 cm para não inoculadas e 34,20 cm para inoculadas) foram semelhantes com as menores alturas (Tabela 6).

Quanto ao comportamento do diâmetro de caule de porta-enxerto, não foi diferente em relação aos resultados observados aos 6 MAI (Tabela 4), onde, aos 12 MAI, o diâmetro dos PE compostos por citrumelo Swingle (mm para não inoculadas e mm para inoculadas) foi maior que os demais, BGC695 (mm para não inoculadas e mm para inoculadas) intermediário e BGC682 (mm para não inoculadas e mm para inoculadas) e *M. australis* × *M. inodora* (mm para não inoculadas e mm para inoculadas) semelhantes entre si (Tabela 6).

O diâmetro do caule da copa de laranjeira-doce 'Valência' sobre o porta-enxerto citrumelo Swingle, assim como aos 6 MAI, foi diferente entre as plantas infectadas (17,27 mm) e não infectadas (15,34 mm), mas ainda com diâmetro maior nas plantas inoculadas (Tabela 6).

Tabela 6. Biometria de mudas de laranjeira-doce ‘Valência’ enxertada em diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao Huanglongbing aos 12 meses após a infecção com *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

N° de ramos						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	4,86	±0,51	Aa ¹	4,17	±0,54	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	2,78	±0,28	Ab	3,15	±0,41	Aab
BGC682	2,75	±0,48	Ab	2,20	±0,20	Ab
BGC695	3,17	±0,31	Ab	3,00	±0,18	Aab

Altura da copa (cm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	119,14	±9,59	Aa	121,83	±8,38	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	40,89	±4,47	Ac	36,31	±2,92	Ac
BGC682	22,00	±5,85	Ac	34,20	±9,97	Ac
BGC695	71,50	±6,58	Ab	84,22	±3,26	Ab

Diâmetro de PE (mm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	20,12	±0,86	Aa	19,56	±1,07	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	6,86	±0,23	Ac	7,09	±0,22	Ac
BGC682	8,20	±0,94	Ac	9,01	±1,26	Ac
BGC695	12,58	±1,17	Ab	12,70	±0,47	Ab

Diâmetro de copa (mm)						
Porta-enxerto	LV não inoculadas			LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	15,34	±0,74	Ba	17,27	±0,49	Aa
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	6,69	±0,27	Ac	6,55	±0,25	Ac
BGC682	5,99	±0,42	Ac	6,95	±0,30	Ac
BGC695	9,11	±0,63	Ab	9,46	±0,26	Ab

¹ Médias seguidas de pela mesma letra (letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas nas colunas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

LV= laranjeira-doce ‘Valência’; PE= Porta-enxerto.

4.5 Taxa de infecção e título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* aos 12 meses após a infecção.

Aos 12 meses após a infecção (MAI), foram amostrados diferentes tecidos vegetais de modo a observar se ocorreu a movimentação da bactéria desde a copa (ponto de inoculação pelos psilídeos infectivos) até as raízes das plantas. As

amostragens de folha e casca da copa confirmaram a presença de CLas na copa das plantas, nesses tecidos o título bacteriano não diferiu estatisticamente entre as combinações avaliadas, com médias de Ct de 21,7 (folha) e 24,9 (casca da copa) para plantas enxertadas em Swingle, 19,5 (folha) e 27,2 (casca da copa) para plantas enxertadas sobre *M. australis* × *M. inodora*, 21,6 (folha) e 26,2 (casca da copa) para plantas enxertadas sobre BGC682 e 20,4 (folha) e 26,8 (casca da copa) para plantas enxertadas sobre BGC695 (Tabela 7).

A taxa de infecção nas folhas da copa de laranja-doce 'Valência' foi avaliada através do número de plantas positivas para CLas em relação ao número de plantas confinadas em março de 2023 com psilídeos infectivos. Assim como aos 6 MAI, plantas enxertadas sobre Swingle e BGC695 obtiveram a maior taxa de infecção das copas de laranja-doce 'Valência', com 86% e 82% respectivamente. Já plantas enxertadas sobre *M. australis* × *M. inodora* e BGC682, as copas de laranja-doce 'Valência' apresentaram pouco mais de 50% de plantas infectadas. Já as taxas de infecção média foram de 52% para *M. australis* × *M. inodora* e 56% para BGC682 (Tabela 7).

O título bacteriano e a taxa de infecção na casca da copa, casca do porta-enxerto e na raiz foi avaliada apenas em plantas que apresentaram valores positivos para CLas nas folhas das copas de laranja-doce 'Valência'. As plantas que não foram inoculadas com sucesso foram dispensadas das avaliações dos outros tecidos da planta e foram destinadas a outros fins.

Na amostragem da casca da copa de laranja-doce 'Valência', 100% das amostras positivas para CLas (Tabela 7), resultado esse que confirma que houve infecção nas copas de laranja-doce 'Valência'. Já nas cascas do porta-enxerto, observou-se que a movimentação da bactéria ocorreu de forma parcial em alguns genótipos avaliados. O controle susceptível à CLas de Swingle teve 100% de infecção, seguido do BGC695, onde 94% das cascas foram infectadas (17 cascas de porta-enxerto positivas de 18 avaliadas). Em *M. australis* × *M. inodora*, a taxa de infecção foi de 69%, com 9 cascas de porta-enxerto positivas de 13 avaliadas. Mesmo *M. australis* × *M. inodora* obtendo menor quantidade de cascas do porta-enxerto infectadas, seu valor de Ct (27,9) não diferiu estatisticamente de Swingle (26,7) e BGC695 (29,4). Em contrapartida, BGC682 teve a menor taxa de infecção, apenas

40% das cascas do porta enxerto CLas positivas (duas amostras de cinco avaliadas) e com valores de Ct próximos ao limiar de detecção (33,3) mais altos em relação aos demais genótipos avaliados, indicando menor multiplicação de CLas nesses tecidos (Tabela 7).

Quando avaliamos as raízes das plantas (radicelas coletadas ao redor de todo o sistema radicular), o controle de Swingle obteve 100% das raízes infectadas, como era o esperado, com média de Ct igual a 29,0. O BGC695 teve 61% das plantas infectadas, com valores de Ct (28,5) semelhantes ao de Swingle (29,0). Porém, em nenhuma das raízes de *M. australis* × *M. inodora* e BGC682 a bactéria foi detectada (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa de infecção e título bacteriano em diferentes tecidos coletados de mudas de laranja-doce 'Valência' enxertada sobre diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao Huanglongbing aos 12 meses após a infecção com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.

Folha da copa - 12 MAI						
Porta-enxerto	LV não inoculadas		LV inoculadas			% ³
	Freq. ¹	Ct	Freq. ²	Ct		
Citrumelo Swingle	7/7	nd	6/7	21,7 ±1,5	a	86%
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	9/9	nd	13/25	19,5 ±0,2	a	52%
BGC682	4/4	nd	5/9	21,6 ±0,4	a	56%
BGC695	6/6	nd	18/22	20,4 ±0,3	a	82%

Casca da copa - 12 MAI						
Porta-enxerto	LV não inoculadas		LV inoculadas			% ⁴
	Freq. ¹	Ct	Freq. ²	Ct		
Citrumelo Swingle	7/7	nd	6/6	24,9 ±0,5	a	100%
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	9/9	nd	13/13	27,2 ±0,8	a	100%
BGC682	4/4	nd	5/5	26,2 ±0,8	a	100%
BGC695	6/6	nd	18/18	26,8 ±0,6	a	100%

Casca do PE - 12 MAI						
Porta-enxerto	LV não inoculadas		LV inoculadas			% ⁴
	Freq. ¹	Ct	Freq. ²	Ct		
Citrumelo Swingle	7/7	nd	6/6	26,7 ±0,3	b	100%
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	9/9	nd	9/13	27,9 ±3,0	b	69%
BGC682	4/4	nd	2/5	33,3 ±0,4	a	40%
BGC695	6/6	nd	17/18	29,4 ±0,8	b	94%

Raiz - 12 MAI						
Porta-enxerto	LV não inoculadas		LV inoculadas			% ⁴
	Freq. ¹	Ct	Freq. ²	Ct		
Citrumelo Swingle	7/7	nd	6/6	29,0 ±1,0	a	100%
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	9/9	nd	0/13	nd		0%
BGC682	4/4	nd	0/4	nd		0%
BGC695	6/6	nd	11/18	28,5 ±0,8	a	61%

¹ Frequência de plantas negativas/total de plantas controle;

² Frequência de plantas positivas/total de plantas inoculadas;

³ % de inoculação;

⁴ % de plantas positivas em relação às inoculadas;

Ct = Cycle threshold; nd = não detectado; LV= laranja-doce 'Valência'; PE = porta-enxerto.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (p ≤0,05).

4.6 Matéria seca das raízes e avaliação visual de compatibilidade de enxertia e sintomas de HLB e CTV

As avaliações de matéria seca de raiz e sintomas visuais de HLB e CTV e compatibilidade de enxertia foram realizadas ao final do experimento, aos 16 MAI.

O porta-enxerto Swingle apresentou o maior volume de matéria seca de raiz em relação aos demais híbridos avaliados, e diferiu estatisticamente entre o grupo inoculado e não inoculado (79,07 e 60,73 g/planta nas não inoculadas e inoculadas, respectivamente), independente da infecção por CLas (Tabela 8). Para os demais genótipos avaliados, a matéria seca de raiz do porta-enxerto não diferiu estatisticamente entre as plantas não inoculadas e as plantas inoculadas. O híbrido BGC695 (20,81 g/planta) apresentou maior volume de matéria seca de raiz do que híbridos de *M. australis* x *M. inodora* (4,93 g/planta) e BGC682 (3,75 g/planta) nas plantas não inoculadas. Entretanto não diferiu desses genótipos quando observamos as plantas inoculadas, com 11,01 g/planta em BGC695, 7,37 g/planta em BGC682 e 4,49 g/planta em *M. australis* x *M. inodora* (Tabela 8).

Tabela 8. Matéria seca das raízes dos diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania potencialmente resistentes ao huanglongbing.

Porta-enxerto	Massa seca de raiz (g/planta)					
	LV não inoculadas		LV inoculadas			
Citrumelo Swingle	79,07	±11,2	Aa	60,73	±6,6	Ba
<i>M. australis</i> x <i>M. inodora</i>	4,93	±0,7	Ac	4,49	±1,0	Ab
BGC682	3,75	±1,1	Ac	7,37	±1,0	Ab
BGC695	20,81	±8,8	Ab	11,01	±1,3	Ab

Médias seguidas pela mesma letra (letras maiúsculas nas linhas e letras minúsculas nas colunas), não diferem entre si pelo teste T de Student ($p \leq 0,05$)

O aspecto visual das raízes dos diferentes porta-enxertos pode ser observado nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.



Figura 1. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' não inoculada enxertada sobre citrumelo Swingle, genótipo suscetível ao huanglongbing.



Figura 2. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' inoculada enxertada em citrumelo Swingle, genótipo suscetível ao huanglongbing.



Figura 3. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' não inoculada enxertada sobre o híbrido *M. australis* × *M. inodora* potencialmente resistente ao huanglongbing.



Figura 4. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' inoculada enxertada sobre o híbrido *M. australis* × *M. inodora*, potencialmente resistente ao huanglongbing.



Figura 5. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' não inoculada enxertada sobre o híbrido BGC682, potencialmente resistente ao huanglongbing.



Figura 6. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranjeira-doce 'Valência' inoculada enxertada no híbrido BGC682 potencialmente resistente ao huanglongbing.



Figura 7. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranja-doce 'Valência' não inoculada enxertada sobre o híbrido BGC695, potencialmente resistente ao huanglongbing.



Figura 8. Imagens ilustrativas de folhas, raízes e caule de laranja-doce 'Valência' inoculada enxertada sobre o híbrido BGC695, potencialmente resistente ao huanglongbing.

Todas as copas de laranjeira-doce ‘Valencia’, exceto para o grupo de plantas enxertadas sobre citrumelo Swingle e que não foram inoculadas, apresentaram sintomas de deficiência ou clorose, mas não apresentaram sintomas claros de mosqueado, característico do HLB (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Além disso, em nenhuma das combinações copa e porta-enxerto observou-se sintomas de incompatibilidade de enxertia como pode ser observado nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Na avaliação do caule dos porta-enxertos, foi possível observar sintomas de CTV, pela presença ou ausência de caneluras. As plantas compostas pelo porta-enxerto citrumelo Swingle receberam, predominantemente, nota 1, pois não foi observada nenhuma canelura em toda a extensão do caule (Figuras 1 e 2). Os outros porta-enxertos, *M. australis* × *M. inodora* (Figuras 3 e 4), BGC682 (Figuras 5 e 6) e BGC695 (Figuras 7 e 8), receberam notas com médias variando de 4 a 5, indicando alta suscetibilidade ao CTV, nesses genótipos as caneluras foram observadas independentemente da inoculação ou não com CLas (Tabela 9), indicando alta suscetibilidade ao CTV. Não foram observadas caneluras nas copas de laranjeira-doce ‘Valencia’ em nenhuma das combinações de copa/porta-enxerto avaliadas.

Tabela 9. Sintomas de canelura em diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania e potencialmente resistentes ao huanglongbing.

Porta-enxerto	Severidade das caneluras				
	LV não inoculadas		LV inoculadas		
Citrumelo Swingle	1,00	±0,0	c	1,00 ±0,0	c
<i>M. australis</i> × <i>M. inodora</i>	4,00	±0,0	b	4,40 ±0,2	b
BGC682	5,00	±0,0	a	4,50 ±0,5	ab
BGC695	5,00	±0,0	a	4,94 ±0,1	a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

LV= laranjeira-doce ‘Valência’

4.8 Expressão relativa de genes

Avaliou-se a expressão relativa de genes relacionados à resposta de defesa, regulação da patogênese e ao estresse em plantas infectadas com CLas analisando amostras de fluxos jovens (V2/V3) emitidos nas copas de laranjeira-doce ‘Valencia’ e

enxertadas sobre diferentes porta-enxertos em dois períodos após a infecção: 48 horas e aos 12 meses.

Ao comparar a expressão gênica dos alvos avaliados, observou-se que para os dois períodos avaliados, tanto as 48 horas após a inoculação, quanto aos 12 MAI, não foi observada diferença estatística entre o controle absoluto e as plantas enxertadas sobre os híbridos de *M. australis* × *M. inodora*, BGC682 e BGC695 para nenhum dos alvos (Figura 9).

Quando comparada a expressão relativa observada as 48 horas após inoculação em relação aos 12 meses, também não foi observada diferença estatística para a maioria dos alvos, com exceção a copa de laranjeira-doce 'Valencia' inoculada enxertada sobre o híbrido BGC695, em que foram observadas diferenças estatística para os alvos WRKY70, WRKY25, RLP7 e PR2 (Figura 9 a, b, c, h), com maior expressão aos 12 MAI e para os alvos GSL5 e NPR1 com maior expressão as 48 horas após inoculação (Figura 9 f, g). A copa de laranjeira-doce 'Valencia' inoculada enxertada sobre o citrumelo Swingle apresentou diferença significativa somente para o alvo USP com expressão relativa maior aos 12 MAI (Figura 9 d).

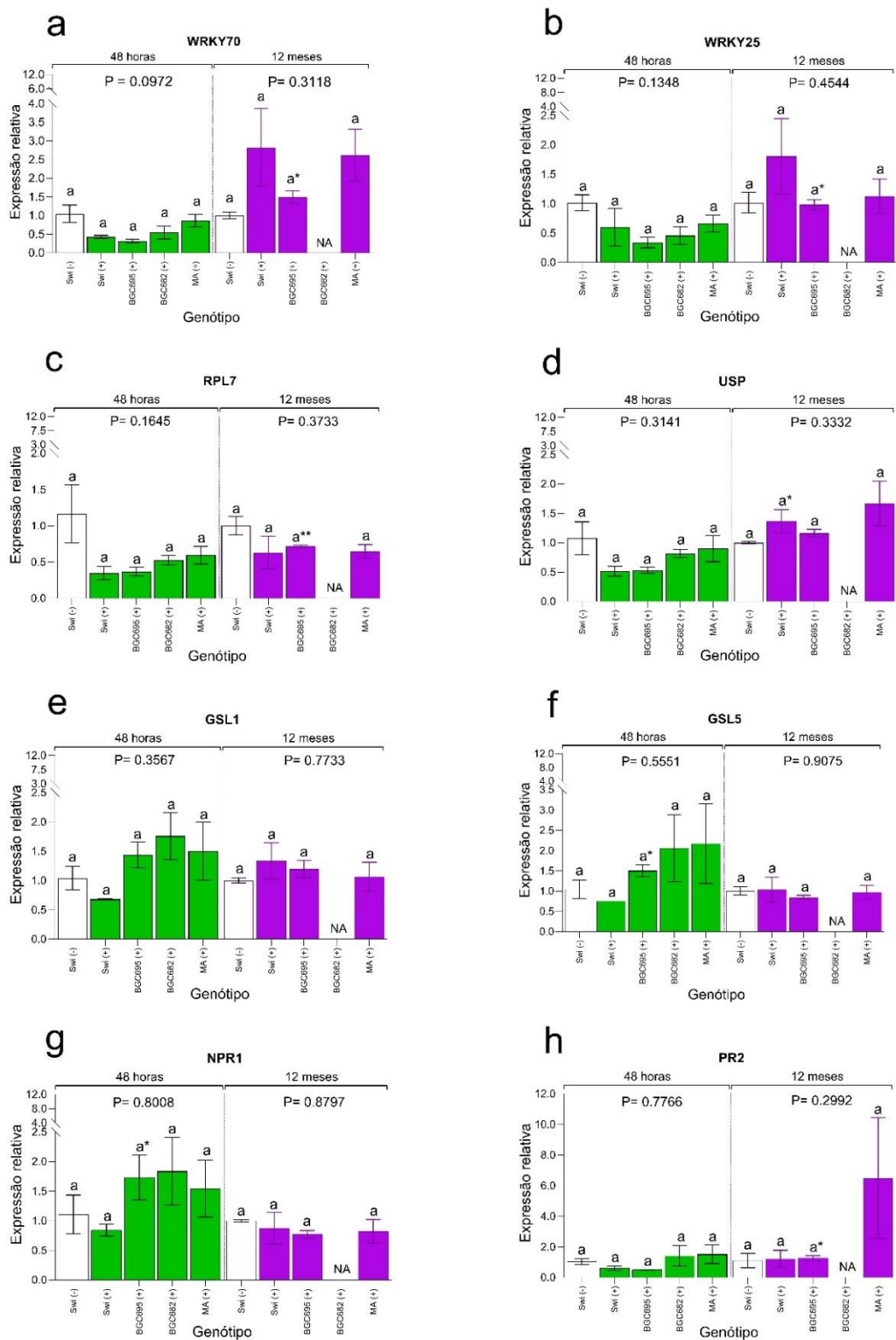


Figura 9. Expressão relativa em folhas de laranja-doce ‘Valência’ enxertadas sobre diferentes porta-enxertos de híbridos originários da Oceania e potencialmente resistentes ao huanglongbing as 48 horas após inoculação e aos 12 meses após a inoculação. Alvos avaliados: (a) WRKY70; (b) WRKY25; (c) RPL7; (d) USP) (e) GSL1; (f) GSL5; (g) NPR1; (h) PR2.

5. Discussão

Considerando a atual e ameaçadora situação do HLB, que coloca em risco a atividade socioeconômica da citricultura, somada a falta de métodos curativos eficazes para a contenção da doença, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial de diferentes híbridos potencialmente resistentes à CLas na posição de porta-enxertos, visando, principalmente, elucidar a capacidade desses acessos em restringir o título e a distribuição bacteriana e reduzir os danos causados pelo HLB em plantas infectadas.

Em um estudo anterior, genótipos de espécies pertencentes a mesma subfamília dos *Citrus* foram testados como pé-franco sob condições de infecção naturais em campo por um longo período, mas não foi possível concluir se eram resistentes à CLas ou ao inseto vetor (Ramadugu et al., 2016). Alguns desses genótipos foram então testados na posição de copa sobre porta-enxerto suscetível à CLas (Alves et al., 2021b). Sete, dos 25 genótipos avaliados, foram considerados resistentes por não apresentarem a presença da bactéria nas folhas da copa 24 meses após a inoculação do porta-enxerto. Para alguns desses genótipos, observou-se que na casca da copa à 5 cm acima da linha de enxertia ainda era possível detectar CLas, possivelmente pela pressão do fluxo de seiva ou talvez porque esses genótipos não são completamente resistentes ou podem apresentar infecção transitória (Alves et al., 2021b). Até o momento nenhum trabalho avaliou esses diferentes híbridos como porta-enxertos.

Partindo desse pressuposto, híbridos de limas da Oceania (*M. australis* × *M. inodora*, BGC682 e BGC695) foram selecionados para teste na posição de porta-enxerto, os genótipos foram selecionados por terem sido classificados como resistentes a CLas e também por terem tido sucesso na propagação por estaquia, uma vez que para alguns desses híbridos as sementes são monoembriônicas, e alguns não geram sementes. Após o desafio através da inoculação da copa com CLas via insetos infectivos, monitorou-se a movimentação bacteriana pela amostragem de diversos tecidos (folha da copa, caule da copa e do porta-enxerto e raízes). Complementarmente, avaliou-se o desempenho agrônomo das diferentes

combinações copa/porta-enxerto em condições controladas (casa de vegetação) e a expressão diferencial de genes relacionados a mecanismos/respostas de defesa.

Um dos critérios de grande importância para reconhecer o potencial agrônomo de um porta-enxerto é validar a sua viabilidade propagativa (Carvalho et al., 2019). Obter estacas dos genótipos de limas da Oceania é extremamente complexo, principalmente pela dificuldade de enraizamento. Anteriormente a esse estudo, vários ensaios envolvendo os diversos genótipos bem como seus híbridos, foram realizados afim de propagar por estaquia as plantas para serem utilizadas em novos experimentos. Dentre eles, alguns genótipos tiveram melhores porcentagens de sucesso no enraizamento, com média de 60% das estacas enraizadas, enquanto que o limoeiro 'Cravo', utilizado como controle, a taxa de enraizamento foi de 98-100% em todos os ensaios realizados (dados não publicados), demonstrando que existe uma limitação para a propagação desses genótipos em larga escala.

Apesar de serem compatíveis por enxertia com *Citrus*, houve dificuldade na propagação das copas de laranjeira-doce 'Valencia' sobre os porta-enxertos selecionados. No momento da enxertia, a altura do enxerto não foi padronizada como normalmente acontece em viveiros comerciais, onde a enxertia normalmente é preferida de 15 a 20 cm da base do caule (Albrecht et al, 2021), uma vez que se optou pela enxertia em diferentes alturas do tronco a fim de aumentar as chances de sucesso para a formação da copa. É importante ressaltar que o objetivo do presente trabalho era, principalmente, entender a dinâmica da colonização de CLas em plantas que possuem como porta-enxerto genótipos potencialmente resistentes à CLas, independentemente da falta de padronização da altura da enxertia. Sendo assim, o porta-enxerto de *M. australis* x *M. inodora* foi maior que os demais genótipos. Também foram obtidas baixas taxas de brotação das gemas de laranjeira-doce 'Valencia', sendo necessário repetir o processo de enxertia em algumas plantas. Essas razões somadas a baixa produção de sementes ou sementes monoembriônicas, juntamente com a complexidade para obter raízes de estacas desses genótipos limita o uso comercial desses porta-enxerto.

Além disso, para lançar novos porta-enxertos, o desempenho agrônomo é um critério de extrema importância. No presente trabalho, somente com os dados da avaliação biométrica antes da inoculação, ainda não era possível inferir sobre os

danos da infecção e colonização de CLas em relação ao desenvolvimento vegetativo das diferentes combinações de copa/porta-enxerto avaliadas. Dentre os genótipos e combinações copa/porta-enxerto, BGC695 apresentou um melhor desenvolvimento em relação aos demais híbridos avaliados. Em *M. australis* × *M. inodora* e BGC682, apesar da boa compatibilidade de enxertia, observou-se maior susceptibilidade ao CTV, fator esse que pode estar associado ao menor desenvolvimento das plantas. No entanto, isso acaba sendo um fator limitante para o uso agrônomo desses híbridos como porta-enxerto, dada a importância do CTV e a prática muito bem estabelecida em viveiros comerciais. As espécies comerciais de laranja-doce são pré-imunizadas com um isolado fraco do vírus, pois esse procedimento oferece proteção às plantas contra formas severas do vírus (Souza e Müller, 2006).

Nas demais avaliações biométricas, realizadas aos 6 MAI e aos 12 MAI, não houve diferença significativa entre as plantas do grupo controle e as inoculadas com CLas. Isso pode estar relacionado ao fato de que foram selecionadas plantas mais vigorosas para a inoculação de CLas. Plantas mais vigorosas tendem a emitir maior número de novos fluxos, fator importante no momento do confinamento dos insetos e no sucesso da inoculação de CLas. Além disso, não foi observado crescimento expressivo para nenhum dos genótipos avaliados, independentemente da inoculação. No entanto, foi possível verificar diferenças significativas entre as diferentes combinações de copa/porta-enxerto avaliadas, nesse caso, BGC695 ficou em um nível intermediário, enquanto BGC682 e *M. australis* × *M. inodora* apresentaram menores índices de desenvolvimento para todas as variáveis biométricas avaliadas. Por outro lado, as plantas do grupo controle, enxertadas sobre citrumelo Swingle apresentaram melhor desenvolvimento da copa. Citrumelo Swingle é o porta-enxerto comercial mais utilizado no Brasil, e isso se deve pelas suas características agrônomicas, citando-se o alto vigor (Girardi et al., 2017; Girardi et al., 2021).

Muito provavelmente, a alta sensibilidade ao CTV prejudicou o desenvolvimento dos híbridos ao longo da condução do experimento. Ao final do ensaio, foi avaliada a presença de caneluras nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto. Observou-se que, logo após a linha de enxertia, os sintomas de canelura nos híbridos BGC695, BGC682 e *M. australis* × *M. inodora* eram muito visíveis, ou seja, os genótipos ao terem contato com o vírus demonstraram serem

altamente suscetíveis ao CTV, mesmo sendo uma estirpe fraca proveniente das borbulhas utilizadas no momento da inoculação para a formação da copa. Essa observação corrobora com os resultados de Smith et al. (2024) que testaram, ao longo de 25 anos, novos gêneros e espécies para o melhoramento genético de porta-enxertos para citros e descobriram que as espécies cítricas da Oceania são extremamente sensíveis ao CTV. No presente trabalho, a suscetibilidade ao CTV foi um fator limitante na avaliação do desempenho agrônomico dos híbridos, pois influenciou na avaliação do real impacto do HLB sobre esses parâmetros. Novos ensaios utilizando borbulhas livres de CTV devem ser conduzidos para avaliar os impactos isolados do HLB sobre esses genótipos.

Devido à alta sensibilidade ao CTV para os híbridos avaliados, também não foi possível inferir se a diferença na massa seca de raízes entre plantas inoculadas e não inoculadas para os genótipos *M. australis* x *M. inodora*, BGC682 e BGC695, ocorreu devido ao CTV ou a inoculação com CLas. Já nas plantas controle de citrumelo Swingle, observamos diferença estatística entre as plantas inoculadas e não inoculadas com CLas. Sabe-se que a presença de CLas reduz a massa de raízes das plantas, como reportado em estudos anteriores (Johnson et al., 2014; Pulici et al., 2022).

Levando em consideração que o desenvolvimento das copas é influenciado pelo porta-enxerto e que o desempenho agrônomico é um dos critérios principais para a seleção de porta-enxerto comerciais (Castle, 2010; Bowman e Joubert, 2020; Morales et al., 2021), os diferentes híbridos avaliados não seriam considerados viáveis para uso como porta-enxerto em campo. No entanto, para confirmar a viabilidade de materiais para o uso comercial se faz necessário um período experimental mais longo e o uso de outras variedades copa. Para prova de conceito, de que materiais resistentes conseguem impedir o estabelecimento de CLas no sistema radicular, o presente trabalho apresenta dados robustos. Um segundo experimento, que está em andamento, avalia os mesmos híbridos sobre copas de 'Valencia' e 'Pera' livres de CTV. Outra técnica que deve ser avaliada é a pré-imunização desses genótipos com outras estirpes fracas de CTV e a avaliação da severidade causada. Assim como apontado por Smith et al. (2024), o obstáculo da suscetibilidade ao CTV evidencia a importância do desenvolvimento de uma metodologia de melhoramento que possa

garantir a esses genótipos resistência ao CTV, colocando-os como promissoras ferramentas para o manejo do HLB.

Em relação a inoculação com CLas, poderíamos ter feito a inoculação da bactéria através da enxertia e formação da copa a partir de borbulhas infectadas, para muitos fins essa técnica se torna muito útil (Lopes e Cifuentes-Arenas, 2021). No entanto, optamos pela inoculação via psilídeos uma vez que se aproxima mais das condições reais de contaminação das plantas no campo. Avaliando a taxa de infecção da copa de laranja-doce aos 6 MAI, Swingle e BGC695 foram os porta-enxertos com maiores índices de sucesso na inoculação (86 e 82% respectivamente), enquanto que *M. australis* x *M. inodora* e BGC682 tiveram em média apenas metade das plantas infectadas (52 e 56% respectivamente). Observando os títulos de CLas nas plantas infectadas, observamos que independente da combinação avaliada, todas as copas apresentaram médias de Ct muito próximas, variando de 20,6 a 23,6. Esses resultados eram esperados, uma vez que laranja-doce 'Valência' trata-se de uma variedade suscetível à CLas. Aos 12 MAI, as plantas mantiveram o alto título bacteriano nas amostras de folha da copa e cascas da copa, com valores de Ct variando entre 19,5 a 21,7, e 24,9 a 27,2, respectivamente. Esses dados evidenciam a completa colonização da bactéria nos tecidos da copa.

Partindo para outros tecidos avaliados, na casca do porta-enxerto, coletada 5 cm abaixo da linha de enxertia, observou-se diferença nas frequências para os diferentes híbridos de citros da Oceania e em relação ao controle: citrumelo Swingle apresentou 100% de infecção, somente uma das plantas do BGC695 estava livre de CLas, já em *M. australis* x *M. inodora* e BGC682 observamos menor frequência de CLas nesses tecidos, 69% e 40% respectivamente. Além disso, o título de CLas foi menor em BGC682, indicando menor sucesso de colonização da bactéria nesse híbrido. Esses resultados corroboram com Alves et al. (2021b), em que na avaliação de cascas da copa de *M. australis* x *M. inodora*, BGC682 e BGC695 aos 5 cm acima da enxertia, e observaram a presença de CLas em 87%, 100% e 86% das amostras, respectivamente. Além disso, Alves et al. (2021b) não detectaram CLas em nenhum dos genótipos que estão sendo avaliados como porta-enxerto. Por outro lado, os autores observaram que a bactéria é capaz de ser translocada pelo floema do caule das plantas enxertadas até certa distância, em direção aos pontos de crescimento

com força de dreno (Raiol Junior et al., 2021), mas provavelmente não consegue se estabelecer e multiplicar nesses tecidos.

Quando avaliamos as raízes das plantas, observamos 100 % de infecção para o grupo controle (porta-enxerto composto por citrumelo Swingle). No híbrido BGC695, CLas foi detectada em 64% das amostras de raízes avaliadas, com valores de Ct semelhantes ao controle suscetível. Esses dados são diferentes dos observados por Alves et al. (2021b), onde a bactéria não foi detectada em BGC695, contudo esse híbrido apresentou alto título bacteriano no caule, demonstrando já uma tendência à menor resistência. É muito provável que o nível de resistência do híbrido BGC695 seja menor, ao que tudo indica, híbridos originários de *Microcitrus* apresentam menores índices de resistência à CLas, inferior à híbridos derivados de *Eremocitrus* (Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021b), corroborando com os resultados observados para *M. australis* × *M. inodora* e BGC682, onde em nenhuma das amostras avaliadas no presente trabalho, houve a detecção de CLas nas raízes. Esses dados apontam para o fato de que CLas consegue ultrapassar a linha de enxertia, mas não consegue se estabelecer nas raízes desses genótipos.

No presente trabalho, avaliamos também a expressão de genes que estejam relacionados aos mecanismos de defesa para verificar se a copa das plantas em que a multiplicação de CLas não ocorreu na raiz, exibiria alguma resposta diferencial. Partimos de uma seleção de diferentes alvos já estudados e validados (Mafra et al., 2013; Dutt et al., 2015; Oliveira et al., 2019; Lally et al., 2021). Quando comparamos a expressão relativa de genes 48 horas após a inoculação e aos 12 meses, não observamos diferenças significativas entre os genótipos em relação ao controle sadio para nenhum dos alvos analisados. Em um estudo mais abrangente, por transcriptoma, Alves (2022) também não observou alterações significativas na resposta de defesa da planta a colonização inicial de CLas, os autores correlacionam esses resultados com o reconhecimento “tardio” da infecção pelas plantas, e ausência de ativação de mecanismos de defesa.

Ao analisar a expressão diferencial nos diferentes períodos, mas para os mesmos alvos, a copa de laranja-doce ‘Valencia’ enxertada sobre BGC695 apresentou diferenças estatísticas para alguns dos alvos estudados, porém, esse híbrido não foi capaz de conter o estabelecimento e a multiplicação de CLas em suas

raízes. Acredita-se que essa diferença observada na expressão gênica pode, possivelmente estar associada à suscetibilidade e resposta de defesa desse híbrido ao vírus do CTV, uma vez que os sintomas de canelura eram mais evidentes nesse genótipo. Trabalhos anteriores correlacionam a expressão diferencial dos alvos estudados com a resposta de laranjeiras a infecção por CLas (Mafra et al., 2013; Dutt et al., 2015; Oliveira et al., 2019; Lally et al., 2021), como não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão dos alvos avaliados, tanto ao início, quanto ao fim da experimentação, não podemos inferir que esses alvos estejam relacionados com a potencial resistência à CLas dos híbridos avaliados e a ausência de multiplicação e colonização de CLas nas raízes.

O presente trabalho trata-se do primeiro em que o uso de porta-enxerto proveniente de híbridos resistente à CLas, mostra-se efetivo em conter a colonização e multiplicação de CLas em tecidos radiculares. Na literatura, estudos disponíveis avaliaram porta-enxertos considerados tolerantes a CLas (Bowman e McCollum, 2015; Bowman et al., 2016a, 2016b), contudo, o uso desses porta-enxertos tolerantes reduziu parcialmente os efeitos da doença nas copas de laranja-doce. Não se sabe se um porta-enxerto resistente à CLas irá afetar o desempenho de uma copa suscetível.

Apesar das dificuldades agrônômicas quanto ao uso dos híbridos avaliados, que foram mencionadas ao início dessa discussão, os resultados deste trabalho abrem margens para novos estudos em campo e a longo prazo empregando os genótipos derivados de limas da Oceania. Outra abordagem seria a melhor compreensão dos mecanismos de defesa desses genótipos para identificação e aplicação de novos alvos em programas de melhoramento genético, seja via biotecnológica, seja por hibridação com variedades comerciais, de modo a obter variedades de porta-enxerto resistentes à CLas, mas ao mesmo tempo tolerantes ao CTV e com desempenho agrônômico mais competitivo.

A alta suscetibilidade ao CTV, observada para os híbridos avaliados também impediu que fosse avaliado o real impacto de CLas sobre caracteres como o desenvolvimento radicular dos porta-enxertos. Por esse motivo, um segundo experimento com mesmas combinações de copa/porta-enxerto, mas que também avalia a influência da presença ou ausência de CTV está em fase de condução. Além

disso, outros estudos devem ser conduzidos para uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a resistência dos genótipos derivados de limas da Oceania, além da busca por alternativas que superem a suscetibilidade ao CTV. Quaisquer ganhos na redução dos danos da doença poderão beneficiar a cadeia citrícola e gerar impacto positivo à longo prazo no manejo do HLB.

6. Conclusões

O híbrido BGC695 não foi capaz de conter o estabelecimento e a multiplicação de CLas em suas raízes e não foi observada a presença de CLas nas raízes de BGC682 e *M. australis* × *M. inodora*. Nenhum dos genótipos estudados na posição de porta-enxerto foi capaz de reduzir o título bacteriano na copa de laranjeira-doce suscetível à CLas. Em razão dos porta-enxertos terem sido afetados pela presença de CTV, não foi possível caracterizar o efeito da ausência de CLas no desempenho agrônômico da copa e expressão diferencial de genes relacionados a mecanismos de defesa na copa.

7. Referências

Achor DS, Welker S, Ben-Mahmoud S, Wang C, Folimonova SY, Dutt M, Siddarame G, Amit L (2020) Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in Citrus sink cells. **Plant Physiology** 188:882–891.

Albrecht U, Bowman KD (2011) Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **HortScience** 46:16-22.

Albrecht U, Bowman KD (2012b) Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science** 185-186:118-130.

Albrecht U, Bowman KD (2019) Reciprocal influences of rootstock and scion citrus cultivars challenged with *Ca. Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae** 254:133-142.

Albrecht U, Zecri M, Williamson J (2021) **Citrus Propagation**. Florida: IFAS Extension, 6 p. (University of Florida-IFAS Extension, HS1309).

Albrecht U, Bowman, KD (2012a) Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Science Horticultural** 147:71-80

Alves MN (2022) **Insights on the interaction between Rutaceae genotypes and the ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ bacterium**. 231 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Unesp, Jaboticabal.

Alves MN, Cifuentes-Arenas JC, Raiol-Junior LL, Ferro JA, Peña L (2021a) Early population dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in susceptible and resistant genotypes after inoculation with infected *Diaphorina citri* feeding on young shoots. **Frontiers in Microbiology** 12:683923.

Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P, Peña L (2021b) Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *Citrus* relatives. **Frontiers in Plant Science** 11:617664.

Alves MN, Raiol-Junior LL, Girardi EA, Miranda M, Wulff NA, Carvalho E, Lopes S, Ferro JA, Ollitrault P, Peña L (2022) Insight into resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ associated to Huanglongbing, in Oceanian citrus genotypes. **Frontiers in Plant Science** 13:1009350.

Ammar ED, George J, Sturgeon K, Stelinski LL, Shatters RG (2020) Asian citrus psyllid adults inoculate huanglongbing bacterium more efficiently than nymphs when this bacterium is acquired by early instar nymphs. **Scientific Reports** 10:18244.

Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (Eds.) (2011) **Manual de Fitopatologia. Volume 1 - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda p. 704.

Andrade MO, Pang Z, Achor DS, Wang H, Yao T, Singer BH, Wang N (2019) The flagella of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and its movement in planta. **Molecular Plant Pathology** 21:109-123.

Baldassari RB, Góes A, Tannuri F (2003) Declínio dos citros: Algo a ver com o sistema de produção de mudas cítricas? **Revista Brasileira de Fruticultura** 25: 357-360.

Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical Applied Genetics** 112:1519-1531.

Bassanezi RB, Bergamin-Filho A, Amorim L, Gimenes-Fernandes N, Gottwald TR, Bové JM (2003) Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology** 93: 502-512.

Bassanezi RB, Lopes SA, Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology** 45:251-264.

Bassanezi RB, Montesino LH, Gasparoto MCG, Bergamin-Filho A, Amorim L (2011) Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 130:577–586.

Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L, Bergamin-Filho A (2013). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease** 97:789-796.

Bassanezi RB, Montesino LH, Sanches AL, Spósito MB, Stuchi ES, Barbosa JC (2007) Effect of Citrus Sudden Death on Yield and Quality of Sweet Orange Cultivars in Brazil. **Plant Disease** 91:1407-1412.

Bassanezi RB, Montesino LH, Stuchi ES (2009) Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125:565-572.

Bayer RJ, Mabblerley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S (2009). A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. **American Journal of Botany** 96: 668-685.

Belasque-Junior J, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Ayres AJ, Tachibana A, Violante AR, Tank-Junior A, Di Giorgi F, Tersi FEA, Menezes GM, Dragone J, Jank-Junior RH, Bové JM (2010a) Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology** 92:285-302.

Belasque-Junior J, Bergamin-Filho A, Bassanezi RB, Barbosa JC, Fernandes NG, Yamamoto PT, Lopes SA, Machado MA, Leite-Junior RP, Ayres AJ, Massar CA (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology** 34:137-145.

Belasque-Junior J, Yamamoto PT, Miranda MP, Bassanezi RB, Ayres AJ, Bové JM (2010b) Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology** 31:53-64

Beloti VH, Alves GR, Coletta-Filho HD, Yamamoto PT (2018) The Asian Citrus Psyllid Host *Murraya koenigii* Is Immune to Citrus Huanglongbing Pathogen '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'. **Phytopathology** 108:1089-1094.

Berk Z (2016) Chapter 1 – Introduction: history, production, trade, and utilization. In: Berk Z (Eds.) **Citrus fruit processing**, p. 1-8.

Bonani JP, Fereres A, Garzo E, Miranda MP, Appezzato-Da-Flória B, Lopes JRS (2010) Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 134:35–49

Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7-37.

Bowman KD, Faulkner L, Kesinger M (2016a) New citrus rootstocks released by USDA 2001–2010: field performance and nursery characteristics. **HortScience** 51: 1208-1214.

Bowman KD, Joubert J (2020) Chapter 6 - Citrus rootstocks. In: Talon M, Caruso M. Gemitter-Junior FG (Eds.) **The Genus Citrus**, p. 105-127.

Bowman KD, McCollum G, Albrecht U (2016b) Performance of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by huanglongbing. **Science Horticultural** 201: 355-361.

Bowman KD, McCollum G, Albrecht U (2021) SuperSour: A new strategy for breeding superior citrus rootstocks. **Frontiers Plant Science** 12:741009.

Bowman KD, McCollum G (2015). Five New Citrus Rootstocks with Improved Tolerance to Huanglongbing. **HortScience**, 50(11), 1731-1734.

Campos JS (1976) **Cultura dos citros**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 100p.

Canale MC, Komada KMA, Lopes JRS (2020) Latency and incubation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus after vector inoculation. **Tropical Plant Pathology** 45: 320-326.

Canale MC, Tomaseto AF, Haddad ML, Coletta-Filho HD, Lopes, J.R.S (2017) Latency and persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology** 107:264-272.

Carbonell-Caballero J, Alonso R, Ibanez V, Terol J, Talon M, Dopazo J (2015) A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus *Citrus*. **Molecular Biology and Evolution** 32: 2015-2035.

Carmo-Souza M, Garcia RB, Wulff NA, Fereres A, Miranda MP (2020) Drench application of systemic insecticides disrupts probing behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Insects** 11:314–325.

Carvalho K, Campos MKF, Pereira LFP, Vieira LGE (2010) Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction normalization in "Swingle" citrumelo under drought stress. **Analytical Biochemistry** 402: 197-199.

Carvalho SAD, Girardi EA, Mourão-Filho FDAA, Ferrarezi RS, Coletta-Filho HD (2019) Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura** 41:e-422.

Castle WS (2010) A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. **HortScience** 45:11-15.

Chapot H (1975) The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus: Basle, Switzerland**, p.14-20.

Chi YH, Koo SS, Oh HT, Lee ES, Park JH, Phan KAT, Wi SD, Bae SB, Paeng SK, Chae HB, Kang CH, Kim MG, Kim W-Y, Yun D-J and Lee SY (2019) The Physiological Functions of Universal Stress Proteins and Their Molecular Mechanism to Protect Plants From Environmental Stresses. **Frontiers in Plant Science** 10:750.

Cifuentes-Arenas JC, Beattie GAC, Peña L, Lopes SA (2019) *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as Short-Term Transient Hosts of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and Implications for the Spread of Huanglongbing. **Phytopathology** 109:2064-2073.

Cifuentes-Arenas JC, Goes A de, Miranda MP de, Beattie GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE** 13:e0190563.

CitrusBR (2019) **A cadeia do suco de laranja brasileiro position paper safra 2018/2019**. Disponível em: < https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2021/03/Position-Paper_2019.pdf>. Acesso em 15 de abril de 2024.

Coelho, YS (1992) **O que há de errado com citricultura baiana?** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 15 p. (Embrapa-CNPMPF).

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu-Junior J, Carvalho SA, Machado MA (2004) First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382.

Damsteegt VD, Postnikova EN, Stone AL, Kuhlmann M, Wilson C, Sechler A, Schaad NW, Brlansky RH, Schneider WL (2010) *Murraya paniculata* and Related Species as Potential Hosts and Inoculum Reservoirs of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', Causal Agent of Huanglongbing. **Plant Disease** 94:528-533.

De Francesco A, Lovelace AH, Shaw D, Qiu M, Wang Y, Gurung F, Ancona V, Wang C, Levy A, Jiang T, Ma W (2021) Transcriptome profiling of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in Citrus and psyllids. **Phytopathology** 112:116-130.

Deng X, Yang X, Yamamoto M, Biswas MK (2020) Chapter 3 – Domestication and history. In: Talon M, Caruso M. Gmitter-Junior FG (Eds.) **The Genus Citrus**, p. 33-55.

Dutt M, Barthe G, Irey M, Grosser J (2016) Correction: Transgenic Citrus Expressing an *Arabidopsis* NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). **PLoS ONE** 11(1): e0147657.

Embrapa Territorial, Fundecitrus (2024a) **Estimativa do estoque de carbono no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Relatório de pesquisa 2024. Araraquara: Fundecitrus: 30 p.

Embrapa Territorial, Fundecitrus (2024b) **Biodiversidade da fauna em propriedades cítricas: estudo de caso**. Relatório de pesquisa 2024. Araraquara: Fundecitrus: 30 p.

FAO Food and Agricultural Organization (2021) **Citrus Fruit Statistical Compendium 2020**, 39p.

FAOSTAT (2023). Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de laranja, limas e limões, tangerinas, mandarins e clementinas e outros citros. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2024.

Feng YC, Tsai CH, Vung S, Hung TH, Su HJ (2015) Cochin China atalantia (*Atalantia citroides*) as a new alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. **Australasian Plant Pathol.** 44:71–80.

Ferreira DF (2019). SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian Journal of Biometrics** 37: 529-535.

Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology** 99:1346-54.

Francis MI, Redondo A, Burns JK, Graham JH (2009). Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **European Journal of Plant Pathology** 124:283–292.

Frederici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics** 96: 812-822.

Fundecitrus (2023) **Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico**. Araraquara: Fundecitrus: 77 p.

Fundecitrus (2024) **Reestimativa da safra de laranja 2023/24 do cinturão cítrico de São Paulo**. Araraquara: Fundecitrus: 77 p.

Garnsey SM, Barrett HC, Hutchison DJ (1987) Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relative species and its potential applications. **Phytophylactica** 19:187-191.

Gasparoto MCG, Hau B, Bassanezi RB, Rodrigues JC, Amorim L (2018) Spatiotemporal dynamics of citrus huanglongbing spread: a case study. **Plant Pathology** 67:1621-1628.

Geraldello CS (2015) A citricultura estadunidense. In.: Geraldello CS (Eds.) **Medidas antidumping e política doméstica: o caso da citricultura estadunidense**. São Paulo: Unesp, p. 85-120.

Gill RA, Li X, Duan S, Xing Q, Müller-Xing R (2024) Citrus threat huanglongbing (HLB) – Could the rootstock provide the cure? **Frontiers in Plant Science** 15:1330846.

Gimenes-Fernandes N, Bassanezi, RB (2001) Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica** 27: 93.

Girardi EA, Cerqueira TSC, Cantuarias-Avilés TE, Silva SR, Stuchi ES (2017) Sunki mandarin and Swingle citrumelo as rootstocks for rain-fed cultivation of late-season sweet orange selections in northern São Paulo state, Brazil. **Bragantia** 76:501-511.

Girardi EA, Pompeu-Junior J, Teofilo-Sobrinho J, Soares-Filho WS, Passos OS, Cristofani-Yaly M, Sempionato OR, Stuchi ES, Donadio LC, Mattos-Junior D, Bassanezi RB, Garcia LAP, Ayres AJ (2021) **Guia de reconhecimento dos citros em campo: um guia prático para o reconhecimento em campo de variedades de laranja-doce e outras espécies de citros cultivadas no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro**. Araraquara: Fundecitrus: 158 p.

Gottwald TR (2010) Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology** 48:119–139.

Gottwald TR, da Graça JV, Bassanezi RB (2007) Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress** doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01- RV

Graham JH, Feichtenberger E (2015) Citrus phytophthora diseases: management challenges and successes. **Journal of Citrus Pathology** iocv_journalcitruspathology_27203.

Halbert SE (2005) The discovery of huanglongbing in Florida. In: 2ND INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING WORKSHOP. **Proceedings...** St. Paul, MN USA: Plant Management Network, p. 50.

Hashemian SMB, Barbosa CJ, Serra P, Duran-Vila N (2010) Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. **Plant Pathology** 59:413-421.

Hilf ME, Sims KR, Folimonova SY, Achor DS (2013) Visualization of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy. **Phytopathology** 103: 545-554.

Hsouna AB, Sadaka C, Mekinić IG, Garzoli S, Švarc-Gajić J, Rodrigues F, Morais S, Moreira MM, Ferreira E, Spigno G, Brezo-Borjan T, Akacha BB, Saad RB, Delerue-Matos C, Mnif W (2023). The Chemical Variability, Nutraceutical Value, and Food-Industry and Cosmetic Applications of Citrus Plants: A Critical Review. **Antioxidants** 12:481.

IBGE (2022) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Produção de Laranja**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/brl>>. Acesso em: 23 abril 2024.

IBGE (2024) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Produção agrícola municipal 2024**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: 23 abril 2024.

Jaciani FJ, Martins EC, Margis R (2018) Otimizações da qPCR. In: Pereira TS (Eds.) **Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 181-187.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of a subdivision of the proteobacteria. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology** 44:397–486.

Johnson EG, Wu J, Bright DB, Graham JH (2014) Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology** 63:290-298.

Kunta M, Da Graça JV, Malik N, Louzada ES, Sétamou M (2014) Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the HLB-infected citrus trees in Texas. **HortScience**. 49:65-68.

Lafleche D, Bové JM (1970) Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orange atteints de la maladie du "greening". **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences** 270:1915-1917.

Lally RD, Donaleshen K, Chirwa U, Eastridge K, Saintilnord W, Dickinson E, Murphy R, Borst S, Horgan K, Dawson K (2021) Transcriptomic Response of Huanglongbing-Infected *Citrus sinensis* Following Field Application of a Microbial Fermentation Product. **Frontiers in Plant Science** 12:754391.

Li W, Hartung JS, Levy L (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods** 66:104-115.

Li W, Levy L, Hartung JS (2009). Quantitative distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology** 99:139–144.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods** 25:402-408.

Lopes SA, Cifuentes-Arenas JC (2021) Protocol for Successful Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from Citrus to Citrus Using *Diaphorina citri*. **Phytopathology** 111:2367-2374.

Lopes SA, Frare GF (2008) Graft transmission and cultivar reaction of citrus to *Candidatus Liberibacter americanus*. **Plant Disease** 92:21-24.

Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR, Bové JM (2009) Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus*

Liberibacter asiaticus is heat tolerant, 'Ca. *L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease** 3:257-262.

Lopes SA, Luiz FQBQ, Martins EC, Fassini CG, Barbosa JC, Beattie GAC (2013) *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease** 97:1563-1570.

Mabberley DJ (1997) A classification of edible *Citrus* (Rutaceae). **Telopea** 7:167-172.

Mabberley DJ (1998) Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). **Telopea** 7:333-344.

Mabberley DJ (2004) *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. **Blumea** 49:481-498.

Machado MA, Locali-Fabris EC, Coletta-Filho HD (2010) *Candidatus* *Liberbacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology** 31:25-35.

Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava L.P, Rodrigues CM, Machado MA (2012) Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS ONE**, 7:e31263.

Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J, Machado MM (2013) *Candidatus* *Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics** 12:14-247.

Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF (2008) Detection of '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. **Phytopathology** 98:387-396.

Martínez-Cuenca MR, Primo-Capella A, Forner-Giner MA (2016) Influence of rootstock on citrus tree growth: effects on photosynthesis and carbohydrate distribution, plant size, yield, fruit quality, and dwarfing genotypes. **Plant Growth**. InTech 232p.

Meneghini M (1946) Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos citros. **O Biológico** 12:285-287.

Meissner-Filho PE, Soares-Filho W, Velame KVC, Diamantino EP, Diamantino MSAS (2002) Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia Brasileira** 27:312-315.

Miles GP, Stover E, Ramadugu C, Keremane ML, Lee RF (2017) Apparent tolerance to huanglongbing in citrus and citrus-related germplasm. **HortScience** 52:31–39.

Miranda MP, Fitches EC, Sukiran NA, Eduardo WI, Garcia RB, Jaciani FJ, Readshaw JJ, Bell J, Peña L (2024) Spider venom neurotoxin based bioinsecticides: A novel bioactive for the control of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera). **Toxicon** 239:107616.

Morales J, Bermejo A, Navarro P, Forner-Giner MA, Salvador A (2021) Rootstock effect on fruit quality, anthocyanins, sugars, hydroxycinnamic acids and flavanones content during the harvest of blood oranges 'Moro' and 'Tarocco Rosso' grown in Spain. **Food Chemistry** 342:128305

Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology** 9:251-268.

Müller GW, Targon MLP, Carvalho SA, Souza AA, Rodrigues JCV (2005) Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR D, DE NEGRI JD, PIO RM, POMPEU-JUNIOR J. **Citros**. Instituto Agrônômico, Fundag, p. 567-604.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids Research** 8:4321-4325.

Nakandala U, Agnelo F, Masouleh AK, Smith MW, Mason P, Williams DC, Henry RJ (2024) The genomes of Australian wild limes. **Plant Molecular Biology** 114:102.

Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F e Kalaki R (2010) **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 137p.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical Applied Genetics** 100:1155-1166.

Oliveira RP, Soares-Filho WS, Passos OP, SCivittaro WB, Rocha PSG (2008) **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 47 p. (Embrapa Clima Temperado-Docmentos, 226).

Oliveira TS, Granato LM, Galdeano DM, Marques JPR, Coerini LF, Freitas-Astúa J, Machado MA (2019) Genetic analysis of salicylic acid-mediated defenses responses and histopathology in the huanglongbing pathosystem. **Citrus Research & Technology** 40:e1049.

Ollitrault P, Curk F, Krueger R (2020) Chapter 4 - *Citrus* taxonomy. In: Talon M, Caruso M. Gemitter-Junior FG (Eds.) **The Genus Citrus**, p. 57-81.

Pandey SS, Vasconcelos FNC, Wang N (2021) Spatiotemporal dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* colonization inside citrus plant and Huanglongbing disease development. **Phytopathology** 111:921-928.

Passos OS, Soares-Filho WS, Sobrinho APC (2013) Origem, classificação botânica e distribuição geográfica. In: Sobrinho APC, Magalhães AFJ, Souza AS, Passos OS, Soares-Filho WS (Eds.) **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa, p. 15-24.

Pelz-Stelinski KS, Brlansky RH, Ebert TA, Rogers ME (2010) Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology** 103:1531–1541

Pompeu-Junior J (2005) Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR D, DE NEGRI JD, PIO RM, POMPEU-JUNIOR J. **Citros**. Instituto Agronômico, Fundag, p. 61-104.

Pulici JDVS, Murata MM, Johnson EG (2022) Early physiological plant response and systemic effects of Huanglongbing infection in split-root plants. **Phytopathology** 112:1833–1843.

Raiol-Junior LL, Carvalho EV, Moreira AS, Marques JPR, Stuchi ES, Peña L, Girardi EA (2022). Graft compatibility classification within Aurantioideae based on biometric traits and the anatomy of graft union. **Agriculture** 12:76.

Raiol-Junior LL, Cifuentes-Arenas JC, Carvalho EV, Girardi EA, Lopes SA (2021) Evidence that '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' moves predominantly towards new tissue growth in citrus plants. **Plant Disease** 105:34-42.

Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan Y, Roose M, Stover E, Lee RF (2016) Long term field evaluation reveals HLB resistance in *Citrus* relatives. **Plant Disease** 100:1858-1869.

Santos M (2013) **Reação de 16 porta-enxertos sob laranjeira 'Valência' ao agente causal, Candidatus Liberibacter asiaticus**. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Scora RW (1975) On the history and origin of citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 102: 369-375.

Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K, Abdullah SNA, Abdullah NAP (2009) Differential reaction of citrus species in Malaysia to huanglongbing (HLB) disease using grafting method. **Am. J. Agri. Biol. Sci.** 4:32–38.

Smith MW, Gultzow DL, Reid M, Huie JE, Newman TK (2024) "Extreme hybrids" from the Australian citrus rootstock breeding program. **Italus Hortus** 31: 43-55.

Sobrinho APC, Passos OS, Soares-Filho WS (2013) Cultivares porta-enxerto. In: Sobrinho APC, Magalhães AFJ, Souza AS, Passos OS, Soares-Filho WS (Eds.) **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa, p. 233-292.

Souza AA, Müller GWA (2006) Premunização no controle da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis 27:57-70.

Sulzbach M, Oliveira RP, Girardi EA, Schwarz SF, Bertolini E, Schneider LA, Gonzatto MP (2017) **Huanglongbing (HLB) dos citros e estratégias de manejo visando prevenção e controle**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 36 p. (Embrapa Clima Temperado-Documents, 450)

Suri S, Singh A, Nema PK (2022) Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook. **Applied Food Research** 2:100050.

Swingle WT, Reece C (1967) The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (Eds.) **The Citrus Industry**. Berkeley, CA: University of California Press, p. 191–430.

Teixeira DC, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, Junior WCJ, Yamamoto PT, Lopes AS, Bassanezi RB, Ayres AJ, Saillard C, Bové JM (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes** 19:173–179.

van Loon LC (1985) Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology** 4(2-3), 111–116.

Vitória MF, Silva LN, Moreira AS, Stuchi ES, Girardi EA (2024) Horticultural performance and huanglongbing impact of rainfed Valencia sweet orange grafted onto 16 rootstock genotypes. **Bragantia** 83: e20230153.

Wang G, Ellendorff U, Kemp B, Mansfield JW, Forsyth A, Mitchell K, Bastas K, Liu CM, Woods-Tör A, Zipfel C, de Wit PJ, Jones JD, Tör M, Thomma BP (2008) A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology** 147:503-517.

Webber HJ, Reuther W, Lawton HW (1967) History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Eds). **The Citrus Industry**. Berkeley, University of California Press, p.1-39.

Wu GA, Terol J, Ibanez V, López-García A, Pérez-Romén E, Borredá C, Domingo C, Tadeo FR, Carbonell-Caballero J, Alonso R, Curk F, Du D, Ollitrault P, Roose ML, Dopazo J, Gmitter FG, Rokhsar D, Talon M (2018) Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. **Nature** 554: 311-316.

Wu T, Lou X, Xu C, Wu F, Qureshil WA, Cen Y (2016). Feeding behavior of *Diaphorina citri* and its transmission of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ to citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 161:104–111.

Wulff NA, Eckstein B, Martins EC, Silva ML da, Sanches MM (2021) **Huanglongbing dos citros: sintomas, bactérias associadas, vetores e diagnóstico**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 34 p. (Embrapa-Circular Técnica, 96).

Xu CF, Xia YH, Li KB, Ke C (1988) Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings**. Riverside, CA, 10:243-248.

Zhang Z, Mabblerley DJ (2008) Citrus Linnaeus. SP. Pl. 2:782 1753. **Fl. China**, 90-96.

Zheng Z, Xu M, Bao M, Wu F, Chen J, Deng X (2016) Unusual Five Copies and Dual Forms of *nrdB* in “*Candidatus* Liberibacter asiaticus”: Biological Implications and PCR Detection Application. **Scientific Reports** 6:39020.